

**ВАЛІДАЦІЯ РОЗРОБЛЕНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ
ВІРУСУ ЕПІДЕМІЧНОЇ ДІАРЕЇ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ**

**Моложанова А. В., Коваленко Г. А., Музикіна Л. М., Галка І. В.,
Спиридонов В. Г., Айшпур О. Є., Ямцун Т. С., Чехун А. І.**

Інститут ветеринарної медицини НААН України, м. Київ, Україна, e-mail: zelunskaj2008@yandex.ru

У даній статті представлені результати першого етапу валідації розробленої тест-системи щодо виявлення РНК вірусу епідемічної діареї свиней методом ПЛР у реальному часі. Наведені результати визначення аналітичної чутливості та специфічності, які свідчать про можливість її застосування для лабораторної діагностики епідемічної діареї свиней.

Ключові слова: епідемічна діарея свиней, валідація, ПЛР

Епідемічна діарея свиней (ЕДС) (porcine epidemic diarrhea virus) – високо контагіозна вірусна хвороба свиней, що характеризується сильною водянистою діареєю і високою смертністю у поросят. ЕДС за клінічними ознаками дуже схожа з трансмісивним гастроентеритом свиней (ТГС) [1, 2].

Збудником ЕДС є РНК-вірус, що відноситься до сімейства *Coronaviridae* (порядок *Nidovirales*). Вірус ЕДС розмножується в ентероцитах нижньої частини ворсинок і крипт кишечника, тому викликає менш інтенсивну діарею і смертність в порівнянні з вірусом ТГС, але з тієї ж причини може тривалий час персистувати в кишечнику свиней [3].

ЕДС уперше було виявлено в Англії в 1971 р серед свиней в період відгодівлі. Хвороба проявлялась спорадичними спалахами ентериту в зимовий час. Основною клінічною ознакою хвороби була водяниста діарея. Дане захворювання отримало назву «епідемічна діарея типу 1». У 1976 р. спостерігали гостру діарею серед свиней різного віку, включаючи поросят. Це захворювання за клінічними проявами нагадувало ТГС і отримало назву «епідемічна діарея типу 2». Етіологічним агентом обох типів діареї був коронавірус, вперше виділений і названий «вірус епідемічної діареї свиней» в 1978 р. [4, 5].

Протягом 1980 і 1990 років епідемічна діарея свиней була широко поширена у країнах Європи: Англії, Бельгії, Німеччини, Франції, Нідерландах, Швейцарії, також була зареєстрована в Японії. У період 1995–2011 рр. ЕДС була зареєстрована у Південній Кореї, Китаї та Таїланді, у 2013 році – у США [6, 7].

Відсутність розроблених на сьогодні засобів лікування та чітких планів щодо профілактики та ліквідації цієї хвороби призвели до її значного поширення у світі. ЕДС завдає значних економічних збитків господарствам. І хоча збитки від ЕДС іноді колосальні, це захворювання не входить до списку МЕБ з особливо небезпечних хвороб.

Діагноз на ЕДС ставлять на підставі епізоотичних даних, клінічних ознак, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень. На перший план виходять сучасні експресні лабораторні методи досліджень, а саме полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [8, 9]. У ході проведення лабораторної діагностики, важливо отримати дані належної якості. Таким чином, дане дослідження направлено на оцінку аналітичної чутливості та специфічності розробленої тест-системи для виявлення РНК вірусу ЕДС методом ПЛР у реальному часі.

Мета роботи – провести перший етап валідації розробленої тест-системи для виявлення РНК вірусу епідемічної діареї свиней методом ПЛР у реальному часі, що включає оцінку аналітичної чутливості та специфічності.

Матеріали та методи. Дослідження було проведено на базі лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» Інституту ветеринарної медицини НААН України.

Для дослідження специфічності тест-системи було використано наступний біологічний матеріал: вірус трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС) – штам «Пурд'ю-115»; цирковірус свиней 2 типу (ЦВС2) – штам «*Stoon 1010*»; вірус репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (РРС) європейського генотипу – штам «*Lelystad*»; ізолят вірусу ЕДС (позитивний біологічний матеріал – ПБМ); культура клітин *Vero* (негативний біологічний матеріал – НБМ).

Для визначення чутливості тест-системи було використано ізолят вірусу ЕДС, який було виділено з біологічного матеріалу в культурі клітин *Vero* зі встановленою інфекційною активністю 4,5 Іг ТЦД50/см³.

Для виділення РНК було використано комерційний комплект «РИБО-сорб», а для проведення зворотної транскрипції – комерційний комплект «РЕВЕРТА-L» (AmpliSens, Росія) згідно інструкцій виробника.

Результат ампліфікації кДНК вірусу ЕДС реєстрували за барвником FAM (канал Green), а результат ампліфікації внутрішнього контрольного зразку (ВКЗ) – за барвником JOE (канал Yellow). Облік результатів ПЛР аналізу: позитивний – значення Ct FAM менше або дорівнює 35 (Ct≤35), це свідчить про ампліфікацію гена, що кодує специфічну ділянку вірусу ЕДС; негативний – Ct FAM відсутнє, але значення Ct JOE менше або дорівнює 35 (Ct≤35). Для проведення ампліфікації у реальному часі було використано «Rotor-Gene Q», виробник «QIAGEN Hilden» (Німеччина).

Результати досліджень. Протягом 2015–2016 років у лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» ІВМ НААН на наявність вірусу епідемічної діареї свиней було досліджено 2063 проби біологічного матеріалу (фекалії та змиви з прямої кишки) від домашніх свиней. За 2015 рік було досліджено 1180 проб, з яких встановлено 13 позитивних. У 2016 році всього досліджено – 883, з них 2 позитивні.

Для визначення специфічності було використано ПБМ та НБМ щодо вірусу ЕДС, а також три сторонні збудники вірусних захворювань свиней (ТГС, ЦВС2, вірус РРСС), які поєднували у співвідношенні 1:1 з ПБМ та НБМ. Результати дослідження зведені в таблиці 1 та представлені на рис. 1.

Таблиця 1 – Результати визначення специфічності розробленої тест-системи

№ з/п	Назва досліджуваного матеріалу	Кількість проб	Результати виявлення кДНК вірусу ЕДС	
			Ct, FAM (M±m)	результат
1	Культура клітин Vero (НБМ)	5	–	негативні
2	Ізолят вірусу ЕДС (ПБМ)	10	24,07±0,78	позитивні
3	Вірус ТГС + НБМ	3	–	негативні
4	Вірус ТГС + ПБМ	3	24,07±0,45	позитивні
5	ЦВС2 + НБМ	3	–	негативні
6	ЦВС2 + ПБМ	3	24,12±0,24	позитивні
7	Вірус РРСС європейського генотипу + НБМ	3	–	негативні
8	Вірус РРСС європейського генотипу + ПБМ	3	23,31±0,15	позитивні

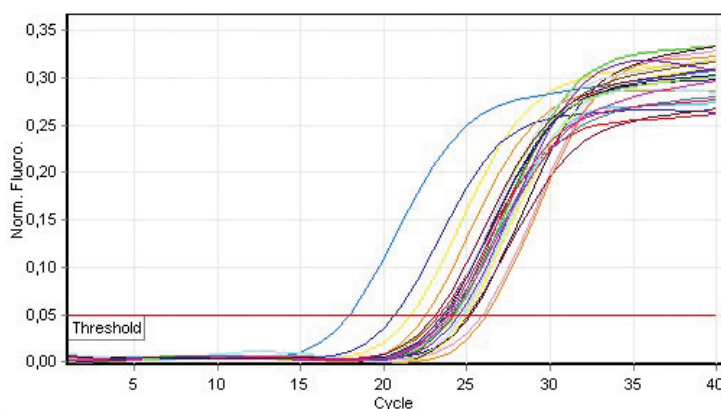


Рис. 1. Результати ампліфікації специфічної ділянки кДНК вірусу ЕДС (Ct FAM/канал Green) щодо визначення специфічності розробленої тест-системи

Аналітична специфічність визначається, як здатність аналізу відрізнити цільову ДНК (мішень) від ДНК інших інфекційних агентів. За результатами проведених досліджень встановлена відсутність перехресних реакцій з штамами інших вірусів, що свідчить про специфічність розробленої тест-системи. У той же час, в пробах біологічного матеріалу, що містили вірус ЕДС, було виявлено специфічну кДНК. Значення Ct позитивних проб на каналі FAM були встановлені в межах 17,94–26,21. Це вказує на здатність обраних нами праймерів точно розпізнавати цільову ділянку кДНК вірусу ЕДС і зв'язуватися з нею за принципом компліментарності.

Аналітична чутливість (межа виявлення) визначається як найменша кількість агенту (цільової ДНК), що може виявляється аналізом. Початковим матеріалом був ізолят вірусу в культурі клітин Vero з інфекційною активністю 4,5 lg ТЦД50/см³. Для визначення чутливості було використано три десятикратних розведення вірусу у двох повторах. Результати досліджень наведені у таблиці 2 та представлено на рис. 2.

Таблиця 2 – Результати визначення чутливості розробленої тест-системи

№ з/п	Назва проби (розведення)	Результати	
		Ct, FAM 1-й повтор	Ct, FAM 2-й повтор
1	ізолят вірусу ЕДС (розведення 1:10)	23,11	23,25
2	ізолят вірусу ЕДС (розведення 1:100)	26,73	27,01
3	ізолят вірусу ЕДС (розведення 1:1000)	29,75	30,02

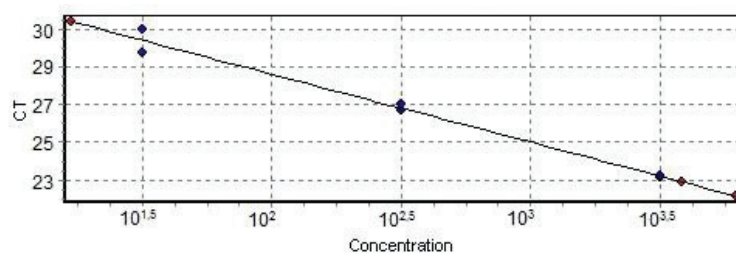


Рис. 2. Стандартна крива граничних циклів (Ct) досліджених проб у відповідних розведеннях для визначення чутливості ($r^2=0,984$).

Позитивні результати було отримано в усіх трьох розведеннях та в обох повторях, показники Ct відповідали прийнятному контрольному значенню розробленою тест-системи. Встановлено високу лінійну кореляцію ($r^2>0,98$) між значеннями Ct, що підтверджує її чутливість.

Висновки. 1. За результатами проведених досліджень встановлена відсутність неспецифічних реакцій зі штамами сторонніх вірусів, що свідчить про специфічність розробленої тест-системи.

2. Розроблена тест-система для виявлення РНК вірусу епідемічної діареї свиней методом ПЛР у реальному часі здатна виявляти кДНК вірусу в розведеннях 1:10–1:1000, що відповідає інфекційній дозі 3,5–1,5 lg ТЦД50/см³.

У перспективах подальших наукових досліджень необхідно провести повну валідацію розробленої тест-системи для виявлення РНК вірусу ЕДС у біологічному та патологічному матеріалі методом ПЛР у режимі реального часу за міжнародними вимогами для її подальшого використання та впровадження у ветеринарну практику.

Список літератури

1. Porcine epidemic diarrhea virus among farmed pigs, Ukraine / A. Dastjerdi, J. Carr, R.J. Ellis et al. // Emerging Infectious Diseases – 2015. – Vol. 21, № 12 [DOI: 10.3201/eid2112.150272].
2. Saif, L.J., Pensaert, M.B., Sestack, K., Yeo, S.G., Jung, K. Coronaviruses. In: Straw B.E., Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., editors. Diseases of Swine. Ames: Wiley-Blackwell; 2012. P. 501-524.
3. Pospischil, A. Light microscopy and ultrahistology of intestinal changes in pigs infected with enzootic diarrhoea virus (EVD): Comparison with transmissible gastroenteritis (TGE) virus and porcine rotavirus infections / A. Pospischil, R.G. Hess, P.A. Bachmann // Zentralbl. Veterinarmed. B. – 1981. – Vol. 28. – P. 564-577.
4. Wood, E.N. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhea / E.N. Wood // Vet. Rec. – 1977. – Vol. 100. – P. 243-244.
5. Neonatal diarrhea of pigs in Quebec: Infectious causes of significant outbreaks / M. Morin, D. Turgeon, J. Jollette, et al. // Can. J. Comp. Med. – 1983. – Vol. 47. – P.11-17.
6. Chen, Q. Isolation and Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses Associated with the 2013 Disease Outbreak among Swine in the United States / Q. Chen, G. Li, J. Stasko, J.T. Thomas et al. // J. Clin. Microbiol. – 2014. – Vol. 52. – P.234-243.
7. Stevenson, G.W. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences / G.W. Stevenson, H. Hoang, K.J. Schwartz, E.R. Burrough et al. // J. Vet. Diagn. Invest. – 2013. – Vol. 25. – P.649-654.
8. Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of CPE groups I-III specific primer sets / R. Zell, A. Krumbholz, A. Henke et al. // J. Virol. Methods. – 2000. – Vol. 88, № 2. – P. 205-218.
9. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях / Б. Т. Стегній, А. П. Герілович, О. Ю. Лиманська з співавт. // Науково-методичний посібник. – Харків. – 2010. – 228 с.

VALIDATION OF THE DEVELOPED TEST KIT FOR PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS DETECTION BY REAL-TIME PCR

Molozhanova A. V., Kovalenko G. A., Muzykina L. M., Halka I. V., Spyrydonov V. G., Ajshpur O. E., Jamcun T. S., Chehun A. I.

Institute of Veterinary Medicine National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The goal of the work. To conduct the first stage of validation of the developed test kit for porcine epidemic diarrhea virus detection by real-time PCR that includes the evaluation of analytical sensitivity and specificity.

Materials and methods. The study included: RNA extraction from biological material with exogenous RNA non-competitive internal control sample (ICS), reverse transcription, cDNA amplification and hybridization-fluorescence detection of amplification products in real time. The result of the exogenous ICS amplification was registered on JOE/Yellow channel, and the result of amplification of cDNA PED virus – on FAM/Green channel.

For evaluation the specificity of the test kit were used following biological material: transmissible gastroenteritis virus (TGEV) – strain “Purd’yu-115”; porcine circovirus type 2 (PCV2) – strain «Stoon 1010»; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), European genotype – strain «Lelystad»; porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain (positive biological material – PBM); Vero cell line (negative biological material – NBM).

For the validation of sensitivity was used the PEDV strain, which was isolated from the biological material using Vero cell line with 4,5 lg TCID50/ml infectious dose.

Results. Studies indicated the developed PCR test-kit did not have cross-reactions with other strains of extraneous viruses. The high linear correlation ($r^2 > 0,98$) between Ct values were obtained.

Conclusions. The developed test kit for porcine epidemic diarrhea virus detection by real-time PCR has the appropriate level of sensitivity and specificity. The obtained results indicate that the test kit may use in laboratory diagnostics.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus, validation, PCR