Молекулярная диагностика вирусной лейкемии кошек

Molecular diagnosis of Felineviral leukemia

Комина А.К.

г. Москва

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-5-19
УДК 578.828:619

Ключевые слова: Полимеразная цепная реакция, вирус лейкемии кошек.

Key words: polymerase chain reaction, feline leukemia virus.

Резюме. Представлены результаты анализа клинического материала от больных и здоровых кошек на присутствие провирусной ДНК экзогенной формы вируса лейкемии кошек. Были разработаны олигонуклеотидные праймеры для обнаружения экзогенной формы вируса лейкоза кошек и оптимизированы условия их применения. Проведено сравнение результатов ПЦР и ИФА. Было проанализировано более ста образцов крови от кошек с подозрением на лейкоз. При помощи ПЦР выявлено присутствие провирусной ДНК в 15 пробах. Из них 12 проб содержали вирусный антиген р-27 по результатам ИФА. Анализ полученных результатов свидетельствует о целесообразности применения ПЦР для первичного скрининга кошек, а также использования ИФА в качестве подтверждающего метода для выявления больных животных. Исследовательская работа выполнена в лаборатории биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ ВИЭВ в 2017–2018 годах в рамках исполнения государственного задания № 0578-2014-0010.

Summary. The results of the analysis of clinical material from sick and healthy cats for the presence of proviral DNA of exogenous form of Feline Leukemia Virus are presented. Oligonucleotide primers were designed and used to detect the exogenous form of the virus. The results of PCR and ELISA were compared in the diagnosis of leukemia of cats. More than 100 blood samples from cats with suspected leukemia have been analyzed. Using PCR, the presence of proviral DNA in 15 samples was detected. Of these, 12 samples contained the viral antigen p-27 according to ELISA. Based on these data it is advisable to apply PCR for primary screening of cats, and ELISA should be used as a confirmatory method for identification of sick animals. Research was conducted at the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Laboratory of Epizootology

and Veterinary Clinic of the FSC VIEV in 2017–18, State Reference No. 0578-2014-0010.

Введение

Вирус лейкемии кошек (Feline leukemia virus, FeLV) относится к отряду *Ortervirales*, семейству *Retroviridae*, подсемейству *Orthoretrovirinae*, роду *Gammaretrovirus*. Он способствует развитию ряда смертельных синдромов у представителей семейства кошачьих. Вирус передаётся горизонтально, поэтому выявление больных и инфицированных кошек является актуальной задачей [1, 2].

Считается, что FeLV произошел от вируса, поражающего грызунов, который в результате трофических отношений между видами адаптировался к заражению представителей семейства кошачьих. Их длительные взаимоотношения привели к тому, что в настоящее время вирус существует в двух формах: эндогенной и экзогенной [1].

Благодаря современным методам молекулярной биологии, на сегодняшний день удалось провести полногеномный анализ FeLV, и было показано, что эндогенная (en) и экзогенная (ex) формы FeLV схожи примерно на 86% процентов на нуклеотидном уровне. Различия между en FeLV и ex FeLV присутствуют в основном в генах *gag* и *env* [1, 2, 8]. Однако, несмотря на значительную схожесть геномов и присутствие эндогенной формы в виде почти полного псевдогена или в качестве отдельных мелких фракций генома, en FeLV не индуцирует заболевание у хозяина. В связи с этим, основной задачей при лабораторной диагностике лейкоза кошек является дифференцировка эндогенной и экзогенной форм вируса [4, 5].

В современной диагностике к основным методам обнаружения вируса лейкоза кошек относятся ИФА и ПЦР. Наиболее достоверный результат может быть получен при совместном использовании этих методов [3, 7].

При постановке ИФА положительный диагноз ставится на основании обнаружения вирусного антигена p27. Однако обнаружить этот антиген во время ранней виремии и латентного периода достаточно сложно. Исследования показали, что обнаружение вирусной РНК и провирусной ДНК служит более надежным способом доказательства прогрессирующей и латентной инфекции соответственно. В целом, было выявлено, что 97.4% кошек, отрицательных по p27, оказались положительными в тестах на провирусную ДНК FeLV, следовательно, эта категория кошек прошла бы незамеченной при диагностике только по p27. Вирусная же РНК была обнаружена у 87.2% p27 антиген-положительных кошек. Так как наличие вирусной РНК в плазме является индикатором виремии, у кошек, положительных в тестах и на p27 и на вирусную РНК, вирус вероятнее всего находится на стадии активной репликации. Кошки из данной категории с повышенной вероятностью могут продемонстрировать клинические проявления болезней, ассоциированных с FeLV, при этом возможно развитие стойкой виремии [3, 5, 6].

Для обнаружения вирусной РНК и провирусной ДНК в материале от животных с подозрением на FeLV используют метод ПЦР. Присутствие эндогенного вируса у большинства домашних кошек и значительная степень его гомологии с экзогенным вирусом усложняет задачу дифференциации этих двух форм методом ПЦР. Специфичность ПЦР зависит от правильного дизайна используемых праймеров [7].

Авторы / Authors

Комина А.К., Бородулина П.И. Забережный А.Д. org@viev.ru
научные сотрудники

Komina A.K., Borodulina P.I. Zaberezhny A.D.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук", г. Москва

Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV", (FSC VIEV), Moscow, Russia

Табл. 1. Характеристика олигонуклеотидных праймеров

Наз-вание	Последовательность 5'-3'	Длина про-дукта, нк	Т° отжига	% GC
Ifwd	TCCAACGCACCCAAAACCT	1394	54	55
Irev	GCTTTAGTCCCTGTTCGAC		52	55

Табл. 2. Программа амплификации ДНК

Цикл	Температура	Время	Циклы
0	95°C	Пауза	
1	95°C	1 минут	1
2	95°C	20 секунд	40
	55°C	20 секунд	
	72°C	20 секунд	
3	72°C	5 минута	1
4	10°C	Хранение	

Целью нашего исследования является анализ клинического материала от больных и здоровых кошек на присутствие провирусной ДНК экзогенной формы FeLV, используя разработанные олигонуклеотидные праймеры, оптимизация условий постановки реакции и сравнение результатов ИФА и ПЦР при диагностике лейкоза кошек.

Материалы и методы

Исследовательская работа выполнена в лаборатории биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ ВИЭВ в 2017–2018 годах в рамках исполнения государственного задания № 0578-2014-0010.

Нуклеиновые кислоты для проведения ПЦР выделяли из цельной крови кошек, поступивших в ВИЭВ для диагностики на основании клинических признаков с подозрением на лейкоз. Выделение проводили на магнитных частицах с силикатной оболочкой при помощи набора реагентов (ЗАО "Силекс", Россия) согласно инструкции производителя.

Сыворотки крови от тех же кошек параллельно были исследованы при помощи ИФА на присутствие специфичного антигена р27 (АртВет, Россия).

В тест-системе для постановки ПЦР использовали олигонуклеотиды, синтезированные на основе последовательности гена gp70, кодирующего поверхностный гликопротеин вируса. Данная последовательность является специфичной для экзогенной формы вируса. Названия, характеристики и последовательности праймеров приведены в Табл. 1.

Исследования проводились с помощью программируемого термоциклера "Терцик" ("ДНК-технология", Россия). Результат амплификации учитывали посредством горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле. В качестве маркера молекулярных масс использовали "100bpLadderDNAMarker (100bp-3000bp)" ("Аxygene", США).

Результаты и обсуждение

Для идентификации вируса и выявления экзогенной формы вируса были подобраны праймеры, которые можно использовать в клинических исследованиях для выявления провирусной ДНК в крови зараженных кошек на любой стадии вирусемии.

Оптимизация условий применения праймеров в ПЦР с использованием референтных положительных образцов крови от больных лейкозом кошек позволила предложить следующий режим проведения реакции (Табл. 2).

Для проведения диагностических исследований из коллекции биологического материала, взятого от кошек с подозрением на лейкоз, были использованы 100 последних образцов, полученных в 2017–2018 годах. Из них 15 оказались положительными в ПЦР. Из результатов ПЦР представленных на электрофореграмме на Рис. 1, видно, что полученные ампликоны соответствуют расчетной молекулярной массе по электрофоретической подвижности.

Отобранные таким образом образцы использовали для сравнения результатов исследований по выявлению вируса лейкоза кошек с помощью методов ПЦР и ИФА. Из таблицы № 3 видно, что с помощью метода ИФА вирус был обнаружен в 12 случаях из 15 (80%), в то время как ПЦР дал 15 положительных результатов (100%). Данный результат свидетельствует о наличии провирусной ДНК у всех исследованных животных. При этом в трех пробах не выявляется вирусный антиген р27. Возможно, у этих животных (№ 3, 10, 12) болезнь находится на более ранней стадии или они здоровы, но латентно инфицированы экзогенной формой вируса лейкемии.

Табл. 3. Выявление вируса лейкоза кошек с помощью методов ПЦР и ИФА

№ пробы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Результ. ПЦР	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Результ. ИФА	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+

Таким образом, в результате исследования были разработаны олигонуклеотидные праймеры для обнаружения экзогенной формы вируса лейкоза кошек и оптимизированы условия их применения, а также, в ходе сравнения результатов ПЦР и ИФА при диагностике лейкоза кошек, было показано, что ПЦР выявляет присутствие компонентов вируса в большем количестве проб, чем ИФА. Поэтому целесообразно применять ПЦР для первичного скрининга кошек с подозрением на лейкоз, а ИФА использовать в качестве подтверждающего метода для выявления больных животных.

Литература/References

1. Забережный А.Д., Костина Л.В., Южаков А.Г. и др. Современная таксономия вирусов // Ветеринария и кормление - 2017 - №6 - с.24-34.

2. Иванова Л.А., Козырева Н.Г., Степанова Т.В., Гулюкин М.И. Некоторые аспекты воспроизведения ретровирусной инфекции в эксперименте на гетерологичных видах животных // "Инфекционные болезни", том14, №S1, Материалы VIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, Москва, 28-30 марта 2016, стр. 117

3. Иванова Л.А., Козырева Н.Г., Степанова Т.В., Гулюкин М.И. Тест-система для выявления ДНК провируса ВЛКРС инфекции методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // "Ветеринария и кормление", №4, 2013 г., стр. 45-47

4. Bande F. et al. Molecular detection, phylogenetic analysis, and identification of transcription motifs in feline leukemia virus from naturally infected cats in Malaysia //Veterinary medicine international. - 2014. - T. 2014.

5. Beatty J. A. et al. Markers of feline leukaemia virus infection or exposure in cats from a region of low seroprevalence //Journal of feline medicine and surgery. - 2011. - T. 13. - №. 12. - С. 927-933.

6. Liu J., O'Connor T., Beall M, Chandrashekar R., Lappin M. Evaluation of rapid diagnostic test kits for feline leukemia virus infection using samples from naturally infected cats // JFMS Open Rep 2016, Jul-Dec; 2(2)

7. The incidence of detecting the domestic cats' leukemia virus in Moscow / Polyakova I.V., Shabaykin A.A., Lakhtyukhov S.V., Gulyukina I.A., Komina A.K., Drozdova E.I., Zaberezhny A.D. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017. №11. pp. 551-562. Crossref DOI: 10.18551/rjoas.2017-11.73.

8. Watanabe. S.; Kawamura, M.; Odahara, Y.; Anai, Y.; Ochi, H.; Nakagawa, S.; Endo, Y.; Tsujimoto, H.; Nishigaki, K. Phylogenetic and structural diversity in the feline leukemia virus env gene // PLoS ONE2013, 8, e61009.

Рисунок 1. Электрофореграмма результатов ПЦР