УДК 619:577 DOI 10.33845/0033-3239-2021-70-12-59-63

Применение молекулярно-биологических методов исследований в птицеводстве

Дмитриев К.Ю., кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник
Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства (ВНИВИП) – филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН

Аннотация: *В настоящее время молекулярно-биологические методы являются одними из самых современных и динамично развивающихся методов исследований. Они нашли широкое применение как при проведении научно-прикладных исследований, так и в практической лабораторной деятельности. Популярность молекулярно-биологических методов обусловлена быстротой и простотой исполнения, высокой степенью чувствительности и специфичности. В современной ветеринарии молекулярно-биологические методы стали неотъемлемой частью программ проведения диагностических и мониторинговых исследований.*

Ключевые слова: *молекулярно-биологические методы, полимеразно-цепная реакция, диагностика, профилактика, инфекционные болезни, птицеводство.*

Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) применяется во всем мире в медицине и ветеринарии по широкому спектру направлений, таких как диагностика инфекционных болезней, в том числе вызываемых патогенами, трудно поддающимися культивированию; оценка вирулентности инфекционных агентов; определение устойчивости бактериальной флоры к антибиотикам; генодиагностика и генетическая дактилоскопия; биологический контроль препаратов крови; контроль биологических препаратов на контаминацию и др.

ПЦР была изобретена в 1983 г. американским биохимиком Кэри Муллисом [1]; впервые материалы по методу ПЦР были опубликованы в ноябре 1985 г. в журнале Science [2]. Метод стал настоящим прорывом в молекулярной биологии и медицине, и в 1993 г. за это открытие Кэри Муллису была присвоена Нобелевская премия по химии [3].

Разработке ПЦР предшествовала расшифровка нуклеотидной последовательности геномов ряда микроорганизмов и открытие фермента tag-ДНК-полимеразы термофильных бактерий *Thermus aquaticus* (Tag-полимераза), *Thermus thermophilus* (Tth-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и др., обитающих в гейзерах. В ПЦР фермент должен длительное время сохранять активность при высокой температуре. Полученный фермент обладает термостойкими свойствами, благодаря чему его период «полужизни» при 95^{0}C составляет 40 минут [3].

Суть метода ПЦР состоит в имитации естественной репликации ДНК, что позволяет обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул. В основе метода лежит принцип комплементарности. В процессе реакции в пробирке происходит многократное копирование (амплификация) определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации ранее синтезированные фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой, благодаря чему происходит многократное увеличение количества специфических фрагментов ДНК, что необходимо для проведения дальнейшего анализа [4].

При этом происходит копирование только того участка, который соответствует заданным параметрам, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В течение 30-40 циклов нарабатывается 10^8 молекул ампликонов (определенный фрагмент, являющийся маркером конкретного возбудителя), которых достаточно для достоверной визуальной детекции фрагмента методом электрофореза в агарозном геле или другим способом [3].

К настоящему времени разработано множество разновидностей ПЦР-анализа: ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR), количественная ПЦР, ПЦР с обратной транскрипцией, гнездовая ПЦР (nested PCR), ПЦР *in situ* [5], рекомбинантная полимеразная амплификация (RPA), вложенная ПЦР, ступенчатая ПЦР (Touchdown PCR), ассиметричная ПЦР, инвертированная ПЦР, метод молекулярных колоний (ПЦР в геле),

ПЦР длинных фрагментов, ПЦР с использованием горячего старта, RFLP- и RAPD-анализы [3].

В последнее время развивается технология ДНК-чипов, которая основана на гибридизации неизвестной нуклеотидной последовательности с расположенными в определенном порядке известными ДНК-последовательностями, иммобилизированными на поверхности стекла или кремния. Результат детектируется по флуоресценции зонда, предварительно меченного флуорофором и гибридизованного с одной из иммобилизированных проб [5].

Чувствительность и специфичность молекулярно-биологических методов существенно выше классических вирусологических методов, серологических тестов (в том числе иммуноферментного анализа), гибридизационных и иммунологических методов. Для ПЦР-диагностики значительно упрощены требования к взятию и пересылке биологического материала, т.к. нет необходимости сохранять возбудителя в живом виде, способного к размножению или репликации. Однако для предотвращения контаминации образцов при отборе проб необходимо соблюдать правила асептики. Для исследования можно использовать различные биологические выделения (слизь, помет), соскобы, кусочки пораженных органов и тканей, кровь, сыворотку крови и др. Пробы могут пересылаться в замороженном виде или в виде мазков-отпечатков на FTA-card.

Объектами исследований в ПЦР также могут быть пробы воды, корма, мазки с поверхности оборудования, стен, пола цехов животноводческих предприятий, поверхности одежды персонала и др. [6].

Типичная ПЦР-амплификация представляет собой многократное повторение следующих реакций:

1. Денатурация. На первом этапе ПЦР происходит тепловая денатурация образца ДНК путем выдерживания его при температуре 95^{0}C в течение 1 мин. В реакционной смеси также содержатся 2 праймера, термостабильная ДНК-полимераза Tag и 4 дезоксирибонуклеотида.
2. Ренатурация. На этом этапе температуру смеси медленно понижают до 55^{0}C, и праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК.
3. Синтез. Температуру повышают до 75^{0}C, которая является оптимальной для ДНК-полимеразы Tag. Начинается синтез комплементарной цепи ДНК, инициируемой 3'-гидроксильной группой праймера [7].

Полимеразная реакция проходит автоматически в термоциклере (амплификаторе) – программируемом термостате, который в очень короткое время может нагревать и охлаждать пробирки с реакционной смесью. В результате трехступенчатого цикла с заданной программой получаются точные копии идентифицируемого участка матричной нуклеиновой кислоты (НК). В первом цикле происходит первое удвоение фрагмента нити НК, ограниченного праймерами. Затем реакция приобретает каскадный характер (цепная реакция), т.е. каждая из нитей служит матрицей для синтеза (полимеризации) нового участка НК, что позволяет увеличивать число копий амплифицируемого фрагмента НК в геометрической прогресии. Течение ПЦР аналогично естественной репликации НК, однако строго фиксировано искусственно синтезированными праймерами [8].

Необходимо отметить преимущества ПЦР перед другими методами лабораторной диагностики, такие как:

1. Универсальность. Вне зависимости от объекта исследования и области применения ПЦР (клиническая медицина, ветеринария, криминалистика, генетика, молекулярная биология) используется стандартный комплект приборов. Метод позволяет обнаруживать любые РНК и ДНК при исследовании любых биологических объектов, даже в тех случаях, когда другими способами это сделать невозможно.
2. Специфичность. Высокая (100%-ная) специфичность метода обусловлена тем, что в исследуемом материале определяется уникальный фрагмент нуклеотидной последовательности, характерный только для данного возбудителя или гена.
3. Чувствительность. Возможность проведения не только качественной (наличие), но и количественной (концентрация) оценки НК. Реальный порог чувствительности коммерческих тест-систем позволяет определять от несколько сот копий до одного возбудителя в пробе.
4. Актуальность ответа (быстрота получения результата). Высокая технологичность и автоматизация метода позволяет получать результаты исследования в день проведения анализа.
5. Возможность доклинической и ретроспективной диагностики. ПЦР позволяет выявлять патоген или дефектный ген в организме еще до развития болезни, например, в инкубационный период инфекции (серонегативной фазе) или при латентном, субклиническом течении болезни, а также в архивном (фиксированном) материале или биологических остатках.
6. Проведение анализа возможно в минимальном объеме пробы (до нескольких микролитров).

7. Возможность одновременной детекции нескольких патогенов в одной пробе без ущерба для чувствительности и специфичности результата.
8. Возможность экспертизы. Полученные результаты ПЦР возможно вносить в компьютерные информационные носители или фотографии для оценки независимыми экспертами.
9. Исключение возможности инфицирования персонала в процессе проведения ПЦР, так как материал может быть дезинфицирован химической или термической обработкой в момент его забора [8-10].

Однако, несмотря на указанные выше достоинства ПЦР, метод имеет некоторые недостатки, которые необходимо учитывать при оценке результатов исследований. Основные недостатки метода следующие:

1. ПЦР – высокотехнологичный метод, требующий соблюдения строжайших правил устройства и оснащения лаборатории. К примеру, на рабочем месте, где происходит приготовление и раскапывание смесей по пробиркам, должен быть установлен фильтр биологической очистки воздуха со степенью более 99%. Это связано с тем, что в воздухе постоянно присутствует взвесь из фрагментов ДНК всевозможных живых организмов. И если в процессе подготовки проб к проведению реакции образец будет загрязнен, то возможно получение ложноположительного результата.
2. Не всегда положительный результат ПЦР означает наличие заболевания. Например, после проведения антибиотикотерапии погибший и уже не опасный возбудитель будет еще некоторое время находиться среди клеток крови и «разбираться» на фрагменты защитной системой организма. Если в этот момент сделать ПЦР, результат окажется положительным.
3. Причиной отрицательного результата ПЦР при наличии явной клинической картины может быть неправильный отбор патологического материала.
4. При создании праймеров используют специфичный для данного микроорганизма фрагмент ДНК, наименее подверженный изменениям, из так называемой высоко консервативной области ДНК. Но изменчивость микроорганизмов может приводить к тому, что некоторые генотипы или штаммы исследуемого возбудителя могут приобретать и накапливать мутации в амплифицируемом (клонируемом) участке генома, и становиться неуловимыми для данного праймера и тест-системы в целом. Использование различных тест-систем – одна из причин разницы в результатах анализов, сделанных в разных лабораториях одним и тем же методом ПЦР.

Причинами ложноположительных результатов могут быть перекрестная контаминация от пробы к пробе в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси; контаминация рекомбинантными плазмидами, содержащими клонированные последовательности детектируемого гена; контаминация продуктами амплификации (амплификонами), которые накапливаются в большом количестве, путем переноса с аэрозолями и через приборы [10].

Возможны и другие диагностические ошибки при использовании молекулярно-биологических методов исследований, которые могут быть связаны с неправильно выбранным методом пробоподготовки (эффективность лизиса клинического материала и экстракции ДНК), с подбором соответствующей ДНК-полимеразы, с деградацией ДНК-матрицы и/или праймеров, непосредственным ингибированием ДНК-полимеразы, с образованием сложных комплексов ДНК-белок, деградацией или фрагментированием исследуемой ДНК вследствие неправильного хранения образца, с наличием в образцах различных детергентов, консервантов (формалин и др.), муколитических веществ, мочевины, ферментов, органических веществ и т.д. [5].

Птицеводство – наиболее интенсивно развивающаяся отрасль сельского хозяйства, использующая передовые технологии в содержании и кормлении птицы, в обеспечении ее здоровья и безопасности продукции. Однако с развитием крупномасштабных птицеводческих предприятий, в условиях импорта племенного и гибридного молодняка и яйца, в последние 20 лет значительно ухудшилась эпизоотическая ситуация по инфекционным болезням птицы, в том числе экзотическим и малоизученным. Об этом свидетельствует увеличение количества прививаемых инфекций в программах специфической профилактики, как в мясном, так и в яичном птицеводстве. Инфекционные болезни, независимо от формы течения, наносят птицеводческим хозяйствам значительный экономический ущерб. Молекулярно-биологические методы позволяют в короткие сроки с высокой точностью выявлять даже следовые количества вирусных и бактериальных нуклеиновых кислот и проводить типирование патологических агентов.

Для проведения диагностических и мониторинговых иссле-

дований в промышленном птицеводстве широко используются серологические (РЗГА, ИФА) и бактериологические методы исследований. Но результаты этих исследований не дают полной картины о спектре микрофлоры, циркулирующей на территории хозяйства. На их основании в современных условиях, когда инфекционные болезни протекают в ассоциированной, субклинической, латентной или атипичной форме, на фоне иммуносупрессивных состояний различной этиологии, невозможно поставить правильный диагноз, дать объективную оценку развития эпизоотической ситуации, разработать эффективную программу специфической профилактики и т.д. Выделение некоторых возбудителей (например, микоплазм, гемофильной палочки) весьма затруднено в связи с условиями отбора и транспортировки проб и отсутствием специалистов-микробиологов, способных культивировать данные микроорганизмы. Выделение вирусных патогенов и их типизация классическими методами является длительным, трудоемким и малодоступным исследованием. К тому же, при перечисленных выше формах течения болезней не всегда удается выделить возбудителя.

Использование молекулярно-биологических методов (ПЦР, геномное секвенирование) в птицеводстве позволяет проводить диагностические и мониторинговые исследования по широкому спектру патогенов вирусной и бактериальной природы и решать следующие задачи:

1. детекция вирусных и бактериальных патогенов, составляющих спектр циркулирующих возбудителей инфекционных болезней в птицеводческом хозяйстве (в том числе в образцах от синантропной птицы), независимо от формы течения (острая, хроническая, субклиническая, латентная, ассоциированная и др.);
2. типизация выделенной микрофлоры, в том числе дифференциация полевых изолятов от вакцинных штаммов;
3. дифференциация патогенов на потенциальных возбудителей инфекционных болезней в конкретном хозяйстве (низкое или следовое содержание в образцах) и на возбудителей, являющихся причиной возникновения болезни (высокое содержание патогена в образце);
4. установление возраста/сроков заражения при исследовании образцов, отобранных в возрастной динамике с интервалом 3-5 дней;
5. корректировка программ специфической профилактики по срокам иммунизации птицы, подбор соответствующих иммунобиологических препаратов (например, соответствие серотипа метапневмовируса, вариантов вируса инфекционного бронхита кур, реовируса, вида микоплазм, сальмонелл и др.);
6. сравнительная оценка результатов при внесении изменений в схему вакцинаций, программу ветеринарно-санитарных обработок, лечебно-профилактических мероприятий;
7. обеспечение комплексного подхода к постановке диагноза, оценке и прогнозированию эпизоотической ситуации.

Развитие современных молекулярно-генетических методов исследований дало возможность, минуя этап культивирования, изучать разнообразие микроорганизмов. Одним из таких методов является T-RFLP-анализ (Terminal restriction fragment length polymorphism), основанный на анализе полиморфизма длины амплифицированных рестрикционных фрагментов ДНК микроорганизмов. Данный метод предназначен для определения количества, относительной численности и таксономической принадлежности всех бактерий экосистемы. Метод дает возможность сравнительного изучения микробиологических сообществ в их развитии и изменении [11].

T-RFLP-анализ позволяет в максимально короткие сроки полно и точно определять состав микрофлоры пищеварительного тракта птиц, выявлять на ранних стадиях возбудителей инфекционных болезней, оценивать действие кормовых добавок (пробиотиков и пребиотиков, кормовых ферментов, подкислителей, антибактериальных препаратов и т.д.), оказывающих влияние на микрофлору кишечника. На основе результатов исследований можно проводить корректировку рационов, лечебно-профилактических мероприятий, что способствует улучшению сохранности и продуктивности птицы [12].

Еще одним важным аспектом применения молекулярно-биологических методов является их использование в создании и разработке иммунобиологических препаратов для специфической профилактики инфекционных болезней птиц, например, исследование куриных эмбрионов, антигенов для производства вакцин и самих вакцин на наличие контаминантов.

Одним из современных направлений является разработка и создание генно-инженерных вакцин. По принципам конструирования и носителю вектора рекомбинантные вакцины условно разделяются на следующие группы:

1. генно-инженерные белковые рекомбинантные конструкции;
2. гетерологичные бактерии или вирусы, используемые как носители соответствующих векторов;

3. искусственно аттенуированные, высоко иммуногенные штаммы, содержащие протективные антигены, из генома которых удалены гены, определяющие вирулентность и токсичность;
4. вирусоподобные конструкции, лишенные генома;
5. генетические конструкции, включающие иммуногенную составляющую и компонент, определяющий другие свойства [13].

Для создания векторных живых вирусных вакцин используется аттенуированный ДНК-содержащий вирус, в геном которого встраивается необходимый клонированный ген. Вирус-носитель вектора активно реплицируется, а продукт встроенного гена обеспечивает формирование иммунитета. Вектор может содержать несколько встроенных генов, отвечающих за транскрипцию и трансляцию соответствующих чужеродных антигенов [14].

В промышленном птицеводстве генно-инженерные вакцины получают все более широкое распространение. Такие вакцины применяются для специфической профилактики инфекционной бурсальной болезни, ньюкаслской болезни, инфекционного ларинготрахеита птиц, инфекции *Mycoplasma gallisepticum*.

Литература

1. Bartlett, J.M.S. Short History of the Polymerase Chain Reaction / J.M.S. Bartlett, D.A. Stirling // PCR Protocols, 2nd Ed.; J.M.S. Bartlett, D.A. Stirling, Eds. (Methods Mol. Biol. - 2003. - V. 226. – P. 3-6).
2. Saiki, R.K. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia / R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona [et al.] // Science. - 1985. - V. 230, No 4732. - P. 1350-1354.
3. Лабораторная диагностика вирусных болезней у животных: уч.-метод. пособие по вирусологии / В.А. Бакулин, П.Ф. Сонин. - СПб., 2019. - 104 с.
4. Гильмиярова, Ф.Н. Полимеразная цепная реакция. История открытия. Новый этап развития / Ф.Н. Гильмиярова, Н.А. Колотьева, О.А. Гусякова [и др.] // Ремедиум Приволжье. - 2017. - №4. - С. 17-21.
5. Руководство по лабораторной диагностике вирусных болезней животных / под общ. ред. А.М. Смирнова, А.Я. Самуйленко, И.М. Донник, Я.Б. Бейкина. - М.: РАСХН, 2008. - 858 с.
6. Mycoplasma gallisepticum и Mycoplasma synoviae: биологические свойства и молекулярная диагностика. Обзор литературы / А.В. Спрыгин, Д.Б. Андрейчук, В.Н. Ирза [и др.] - Владимир: ВНИИЗЖ, 2010. - 63 с.
7. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. - М.: Мир, 2002. - 589 с.
8. Жумина, А.Г. Применение полимеразно-цепной реакции в медицине // Вестник Карагандинского ун-та, сер. «Биология. Медицина. География». - 2011. - №1. - С. 47-56.
9. Бородин, Е.А. ИФА и ПЦР – современные методы клинической лабораторной диагностики // Поликлиника. - 2012. - № 2. - С. 16-22.
10. Биологическая безопасность: молекулярно-клеточные аспекты диагностики зооантропонозов / А.В. Иванов, Э.М. Плотникова, Р.Н. Низамов, А.А. Иванов. - М.: Планида, 2012. - 784 с.
11. Молекулярная биология / А.Л. Брюханов, К.В. Рыбак, А.И. Нетрусов. - М.: МГУ, 2012. - 480 с.
12. Нормы содержания микрофлоры в желудочно-кишечном тракте цыплят-бройлеров. Методические рекомендации / Г.Ю. Лаптев, Н.И. Новикова. Л.А. Ильина [и др.]. - СПб.: БИОТРОФ, 2015. - 28 с.
13. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 608 с.
14. Bloom, B.R. A Book about Vaccines / B.R. Bloom, P.-H. Lambert. - 1st Ed. - San Diego (CA): Academic Press, 2003.

Для контакта с автором:

Дмитриев
Константин Юрьевич
E-mail:
vnivip.dmitriev-18@yandex.ru

Application of Molecular Biological Research Methods in Poultry Farming

Dmitriev K.Yu.

Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Poultry Institute" of Russian Academy of Sciences

Summary: *The molecular biological methods are currently considered the most modern and dynamically developing research methods. They have found wide application in scientific and applied research and in vet laboratory practice. The popularity of these methods is related to fast and simple techniques of analyses featuring high sensitivity and specificity. In modern veterinary medicine these methods have already become an intrinsic part of diagnostic and monitoring research programs.*

Keywords: *molecular biological methods, polymerase chain reaction, diagnostics, prevention, infectious diseases, poultry farming.*