

ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ SYBR GREEN I ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ

М.К. Исакеев , Ж.Ч. Орозов , М.А. Ахмеджанов , С. А. Джээнбаева 

Кыргызский научно-исследовательский институт им. А. Дуйшеева,
 г. Бишкек, Кыргызстан

Аннотация: Проведена диагностика чумы плотоядных с применением полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Для проведения ПЦР-РВ применялся флуоресцентный краситель SYBR Green I. С помощью ПЦР-РВ проверяли 106 собак в окрестностях города Бишкек. Из 106 собак, 10 были здоровыми и использовались в качестве контроля. Из 96 собак получены клинические образцы, из 87 выявлен возбудитель чумы плотоядных и 9 дали отрицательный результат. Метод ПЦР в последние годы успешно применяется в ветеринарной практике и в научных центрах страны для диагностирования инфекционных заболеваний сельскохозяйственных и домашних животных. В ветеринарной практике и науке при определении инфекционных заболеваний ПЦР является стандартной процедурой, которая позволяет определить наличие гена возбудителя. При чуме плотоядных применение метода ПЦР, считается необходимой процедурой, так как другие методы менее чувствительны и мало эффективны. Применение ПЦР-РВ упрощает диагностику, и экономит время проведения анализа, чем ПЦР в классическом варианте. Поэтому на сегодня, в нашей стране считается актуальной внедрение ПЦР-РВ в практическую ветеринарную диагностику.

Ключевые слова: чума плотоядных; диагностика; ПЦР-РВ; SYBR Green I; вирус; собака.

Введение

Вирус чумы плотоядных относится к семейству парамиксовирусов (*Paramyxoviridae* от греческого *рага* – около и *тучо* – слизь). В семействе выделено два подсемейства: *Paramyxovirinae* и *Pneumovirinae*. В свою очередь *Paramyxovirinae* состоит из трех родов: *Paramyxovirus*, *Morbillivirus* и *Rubulavirus*. Возбудитель болезни чумы плотоядных относится к роду *Morbillivirus* (от лат. *Morbillus* – корь), к этой же группе относится вирус кори человека, вирус чумы крупного рогатого скота и вирус чумы мелких жвачных животных. Морбилливирусы имеют антигенное родство между собой и могут давать перекрестный иммунитет [1, с. 268; 272; 274].

Геном морбилливирусов представлен единой односпиральной линейной молекулой минус-РНК, состоящей из 15-16 тыс. нуклеотидов. РНК этих видов не обладает инфекционностью и составляет всего 0,5% массы вириона. В геноме содержится 6 основных генов (N, P, M, F, H и L), которые синтезируют 7 (P ген синтезирует два разных полипептида, функция одного из них не известна) полипептидов, три из которых связаны с нуклеокапсидом, а 3 входят в состав липопротеидной оболочки, причем 2 из последних являются гликопротеинами. Гликопротеины образуют выступы наружной оболочки и отвечают за адсорбцию вирионов на клеточной поверхности и слияние клеток [2, с. 411; 3, с. 155; 156].

Чума плотоядных – остропротекающая заразная болезнь домашних собак и многих следующих видов животных: *Canidae*, *Mustelidae*, *Ursidae*, *Felidae*, *Viverridae*, *Ailuridae*, *Hyaididae* и *Procyonidae* (гималайский енот, куница, барсук, хорьки, ласка, шакалы, красная лисица, американская карликовая лисица, австралийский динго, енотовидные собаки, европейские и американские барсуки, горностаи и др.). В последние годы присоединился к этой группе еще один вид – обезьяны [4, с. 442; 5, с. 501]. Еще один случай зарегистрирован в 1987-1988 году на Байкале, где пало несколько тысяч тюленей. Вначале было загадочное явление массовой гибели этих животных, но изучив все возможные варианты гибели тюленей, ученые обнаружили у них вирус, генетически принадлежащий к роду *Morbillivirus*. Генетические анализы показали, что вирус, найденный в трупах тюленей, генетически на 84% совпадал с вирусом чумы плотоядных. По белку М вирус чумы плотоядных и вирус, найденный в трупах тюленей, были идентичны на 90%, так как М ген, считается самым консервативным геном морбилливирусов. Соответственно М ген отвечает за синтез М белка. Сравнительные анализы М гена с другими представителями морбилливирусов дали совпадение всего на 73-77%. Еще один случай зарегистрирован в 1994 году, когда вирус чумы плотоядных нанес значительный ущерб экологии Национального парка Серенгети (Танзания). В результате эпизоотии поголовье львов сократилось на 35% [1, с. 274]. Вероятным источником инфекции, исследователи считали домашних собак, обитающих по соседству с дикими животными. В литературных источниках, отмечают, что почти все плотоядные животные подвержены патогенности вируса чумы плотоядных. Однако, доказать это сложно, так как почти все виды плотоядных животных дикие. Однако вирус чумы плотоядных в эпизоотологическом плане не для всех животных одинаково патогенен. Для некоторых видов плотоядных животных летальность при чуме плотоядных очень высока, у других животных инфекция проходит только с повышением температуры тела и легким ослаблением организма [4, с. 441]. Кроме видовой патогенности вирус чумы плотоядных имеет и возрастные отличия течения болезни. Так, у домашних собак щенки в возрасте 1-3 месяцев более устойчивы к заражению, что связано с иммунитетом, полученным с молоком матери; в возрасте 4-6 месяцев заболевают в 74% случаев, при этом летальность очень высокая, в возрасте 6-12 месяцев восприимчивость 50-60%, с одного года до двух лет около 40%. Собаки среднего возраста более устойчивы и летальность низкая. Однако с возрастом (от 7 лет) собаки становятся более чувствительными. У многих чувствительных видов животных высокий уровень заболеваемости и заражение обычно происходит в более молодом возрасте, от 2,5 до 12 месяцев [1, с. 276]. С древних времен по настоящее время вирус чумы плотоядных циркулирует во всех странах мира.

Многообразие симптомов болезни затрудняет своевременную и достоверную постановку диагноза. Поэтому при диагностировании чумы плотоядных, в первую очередь, надо выяснить эпизоотологическую ситуацию в данном регионе, где обнаружился очаг инфекции. Если животное пало, проводят патологоанатомическое вскрытие. Наиболее надежным для постановки точного диагноза является лабораторное исследование [6, с. 162].

Для постановки диагноза, предварительного диагноза ветеринарный врач должен изучить у больного животного пораженные респираторные органы, так как в первую очередь поражаются именно дыхательные органы; температуру, есть ли признаки катарального гастроэнтерита, катаракты слизистых оболочек глаз и носа с серозными или гнойными истечениями, гиперкератоз подушечек лап, образования большого количества перхоти на коже, эпилепсия, парез, поражение центральной нервной системы с судорогами, менингит и менингоэнцефалит. Если любые три или четыре из указанных признаков присутствуют у больных животных, можно подозревать чуму плотоядных.

У домашних собак надо исключить следующие схожие признаки заболевания: болезни дыхательных органов простудного характера, вызванные патогенными бактериями,

инфекционный гепатит, парвовирусный гастроэнтерит, бешенство, лептоспироз, пироплазмоз, глистные заболевания [1, с. 280].

Инфекционный период у собак протекает преимущественно с поражением печени и желудочно-кишечного тракта. Симптомы поражения органов дыхания и центральной нервной системы проявляются редко и только в запущенных случаях.

При парвовирусном энтерите воспаление органов дыхания отсутствует, нет поражений центральной нервной системы. На первый план выступает геморрагическое воспаление желудка и кишечника, обезвоживание и воспаление сердечной мышцы [7, с. 451].

При бешенстве выраженный паралич мышц глотки, нижней челюсти и всех конечностей.

Сальмонеллез протекает без гнойных ринитов и конъюнктивитов, сопровождается обильным поносом. При вскрытии селезенка увеличена в 3-5 раз против нормы.

При остром течении пироплазмоза наблюдается потеря аппетита, температура тела достигает 40-42°C, появляется кровавая моча, все видимые слизистые оболочки желтушны [8, с. 411].

Своевременная и точная диагностика при любых инфекционных заболеваний стоит в приоритете, в том числе в обнаружении вируса чумы плотоядных. Своевременность диагностирования инфекционных заболеваний дает возможность контроля эпизоотии в местностях. Особенно важно проведение лабораторного диагностирования, когда клинические симптомы изменчивы. Возбудитель чумы плотоядных имеет мультисимптомность, затрудняющую диагностику при клинических исследованиях. Мультисимптомный характер заболевания чумой плотоядных часто принимается за другое заболевание. Обычно опытные ветеринарные врачи, замечают заболевание чумой опираясь на эпизоотологические показатели местности и направляют материал в лабораторию для подтверждения. Из лабораторных методов диагностирования при чуме плотоядных самым эффективным методом диагностирования является ПЦР анализ [9, с. 158]. На сегодняшний день ПЦР анализы в нашей стране являются достаточно распространенными для диагностирования различных видов заболеваний. В финансовом плане стоимость ПЦР анализов равноценно серологическим исследованиям. При равноценной стоимости серологическими и другими видами диагностических средств метод ПЦР имеет ряд преимуществ по чувствительности, чем остальные методы диагностики.

Материалы и методы

Исследуемые материалы были собраны от животных в течение последних двух лет, проживающих в г. Бишкек и в окрестностях города. Для диагностирования использовали 200 мкл или 100 мкл жидкости, содержащий биологические материалы, взятые от подозреваемых собак на чуму плотоядных. Выделения РНК и обратную транскрипцию проводили в соответствии с инструкциями наборов для выделения РНК «РИБО-сорб». Для каждой серии анализов использовали положительные (К+) и отрицательные (К-) контроли. В качестве положительного контроля использовали вакцину и деионизированную воду в качестве отрицательного контроля. Контроли использовались для выделения РНК и для обратной транскрипции. Для этапа проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) также использовались контроли. Таким образом, в конце получения результатов проверяли 4 контрольных образца для каждой серии анализа.

Результаты и обсуждение

При определении чумы плотоядных используются различные диагностические методы: клинические, гистологические, серологические и молекулярно биологические. Последний метод, считается самым эффективным и чувствительным методом при определении возбудителя чумы плотоядных в различных стадиях и течениях болезни [9, с. 160]. Кроме

этого, молекулярно-биологический метод в нашем случае ПЦР-РВ, способен обнаружить возбудителя у носителей вируса, до появления у животных клинических симптомов [9, с. 157]. Обнаружение вируса на ранних стадиях позволит контролировать распространение вируса в местах появления эпизоотии.

Учитывая преимущества метода диагностики ПЦР-РВ, нашей целью стало применение ПЦР-РВ при диагностике чумы плотоядных. Для достижения цели, мы решили применить флуоресцентный краситель SYBR Green I для детекции результатов ПЦР в режиме реального времени. Так как, ПЦР-РВ является относительно чувствительным методом по сравнению с классическим методом ПЦР (классический метод ПЦР – условно обозначили метод ПЦР считывающие конечные результаты в агарозном геле) [10, с. 60]. Еще одна немаловажная особенность ПЦР-РВ является в экономии времени, то есть предварительные результаты, можно увидеть до окончания процесса амплификации. Это дает возможность сэкономить время оператора, проводящего лабораторное исследование. Кроме этого, он является безопасным методом для здоровья, работающего оператора, чем классический вариант этого вида реакций. В классическом ПЦР для детекции полученных результатов необходимо в конечном итоге проводить электрофорез в агарозном геле содержащий краситель. В большинстве случаев используется бромистый этидий. Как правило, бромистый этидий является сильным мутагеном для организма человека и животных. ПЦР-РВ исключает этот момент, и используются другие красители и для детекции результатов не происходит контактов с работающим персоналом, так как аппарат, предназначенный для проведения ПЦР-РВ, считывает в закрытых пробирках в процессе амплификации. Читка результатов, прямо в процессе и закрытом положении уменьшает случаи контаминации многократно. Таким образом, ПЦР-РВ имеет много преимуществ, относительно классическому виду этого метода. Учитывая все преимущества этого метода, мы решили адаптировать классический ПЦР на ПЦР-РВ. При проведении ПЦР-РВ также необходимо найти температуру отжига праймеров. Для определения отжига праймеров, мы проводили градиент температуры для проведения ПЦР-РВ. На классическом ПЦР отжиг праймеров был при 55°C, однако для отжига праймеров сильно влияет используемый буферный раствор. При использовании ПЦР смеси с красителем используется специальный буферный раствор, позволяющий давать хорошее свечение и одновременно создающий хорошие условия для работы фермента. Обычно ПЦР-РВ температура отжига используется выше, чем в классическом ПЦР. В виду использования температуры отжига ближе к температуре элонгации, шаг элонгации 72°C не используется. Учитывая все моменты, заранее определенная температура отжига для классического ПЦР 55°C, мы решили градиент температуры начать с 55°C и выше до 62°C. для этого использовалась следующая реакционная смесь:

Для постановки ПЦР-РВ с подобранным праймерами нами использованы следующие реактивы с объемом реакционной смеси 25 мкл:

- 5,25 мкл деионизированной воды
- 5 мкл 5x буфера + краситель SYBR Green I
- 0,5 мкл 10x dNTPmix
- 1,5 мкл 25 mM MgCl₂
- 3,75 мкл 0,6 μM смеси праймеров прямого
- 3,75 мкл 0,6 μM смеси праймеров обратного
- 0,25 мкл Taq ДНК полимеразы
- 5 мкл ДНК образца

и градиент температуры отжига: 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C и 62°C. Так как у нас ПЦР продукт 681 п.н. и это считается для ПЦР-РВ длинным, поэтому, мы также использовали стадии элонгации 72°C. Итого у нас получился следующие температурные режимы:

- 95°C – 20 сек. денатурация;
- 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C – 30 сек. температуры отжига
- 72°C – 15 сек. элонгация

Итого 40 циклов.

В конце экспериментов, мы получили, оптимальную температуру отжига праймеров 60°C. Результаты эксперимента показаны на рис. 1.

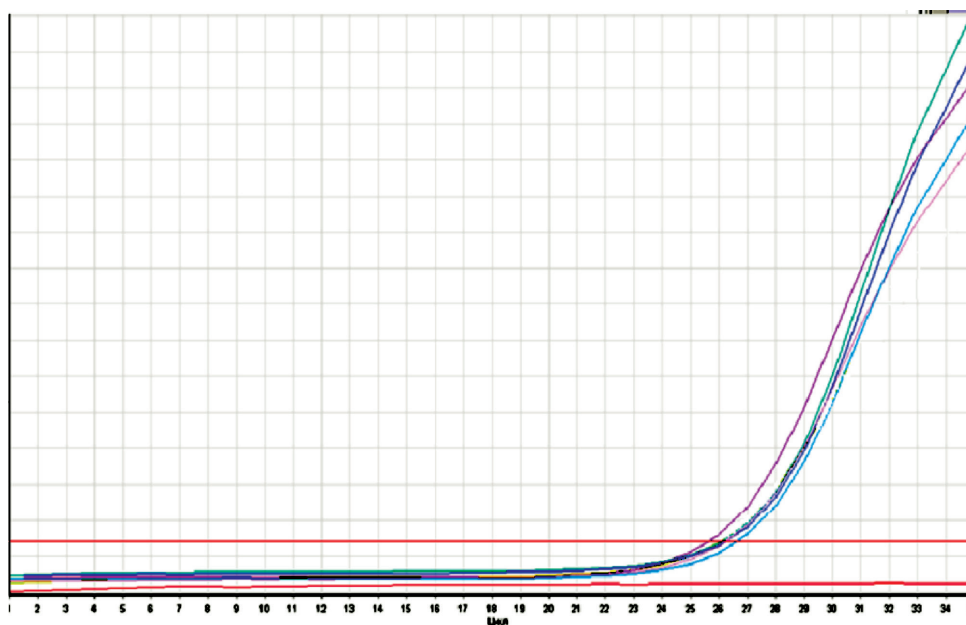


Рисунок 1 – Результаты ПЦР-РВ

Как видно на рисунке 1 постановка ПЦР-РВ при температуре отжига праймеров прошла успешно, все положительные образцы пересекли пороговую линию после 25 циклов, контрольный отрицательный образец остался под пороговой линией. Результаты считались положительными, если пороговая линия была, ниже 35 циклов. Если пороговая линия оказалась, больше 35 и график флуоресценции образовался S образную форму, то образцы анализировались повторно, в остальных случаях считались отрицательными. В нашей работе мы принимали в качестве красителя SYBR Green I. Использование красителя SYBR Green I является самым простым методом среди методов ПЦР-РВ, так как в реакцию смесь кроме красителя больше ничего не требуется. Однако у этого метода есть недостатки, относительно к другим методам ПЦР-РВ. Например, TaqMan включает себя меченый зонд с красителем и в другом конце гасителем. Этот метод, считается более точным методом, так как зонды также как праймеры специфичны, и они прикрепляются только к комплементарному участку исследуемого материала. Без комплементарности флуоресценция происходить не будет. Таким образом, TaqMan метод работает точнее, но стоимость меченых зондов стоит дороже, чем красителя SYBR Green I. В случае SYBR Green I принцип работы отличается. SYBR Green I флуоресцирует, связываясь с любой двухцепочечной молекулой ДНК. По этой причине, краситель SYBR Green I может давать свечение даже с побочным продуктом, образовавшимся во время реакции. Чтобы исключить такие моменты, мы проводили эксперименты, используя различные концентрации к ДНК, а также РНК. Кроме этого, мы добавляли большое количество ДНК других микроорганизмов. После каждой реакции проверяли достоверность результатов в агарозном геле рис. 2.

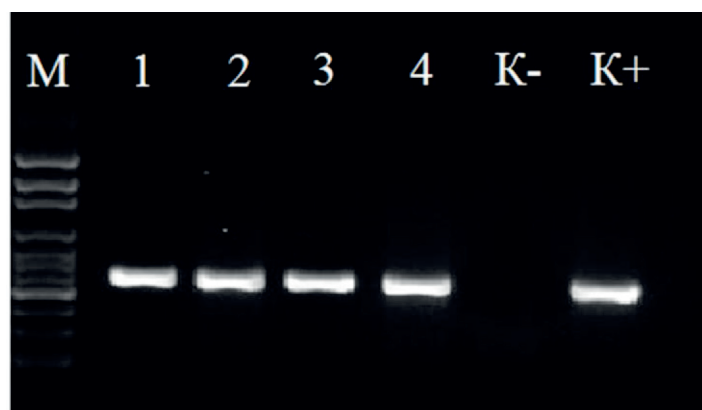


Рисунок 2 – ПЦР продукты после амплификации методом ПЦР-РВ.
М – молекулярный маркер 100 п.н., № – 1 по 4 образцы,
К- отрицательный контроль и К+ положительный контроль.

Как видно, на рисунке 2 все образцы получились чистыми, без каких либо загрязнений. Отрицательный образец не показал образования продуктов, хотя, мы туда добавляли молекулы ДНК различных других вирусов. В ходе экспериментов с красителем SYBR Green I мы, получили чистый ПЦР продукт и достоверные результаты. Таким образом, можно сказать, что разработанный ПЦР-РВ с красителем SYBR Green I работает достаточно успешно. Применяя ПЦР-РВ, мы обработали 96 образцов полученных от клинически подозреваемых на чуму плотоядных и образцы от 10 здоровых собак для контроля. В качестве положительного контроля использовали вакцинный штамм Onderstepoort. В конце исследований из 96 собак 87 показали положительные результаты, остальные 9 показали отрицательные результаты. Для достоверности результатов отрицательные образцы также проверяли на агарозном геле, их результаты также оказались отрицательными.

Заключение

В настоящее время быстрота и точность диагностики играет очень важную роль при контроле эпизоотической ситуации в стране. И одним из наиболее востребованных и массово эксплуатируемых молекулярных методов диагностирования инфекционных заболеваний является ПЦР с применением красителя SYBR Green I и TaqMan-системой. TaqMan-система более специфична, чем SYBR Green. Однако SYBR Green, считается универсальным методом и более простым и самым дешевым методом среди метода ПЦР-РВ [10, с. 61]. Разработанный нами ПЦР с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green может использоваться как замена классического ПЦР метода, и может применяться при массовом тестировании вируса чумы плотоядных.

№10
2022

Литература

- 1 Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомин Н.В. Вирусные болезни животных // – Москва: ВНИТИВП, 2001. – 928 с.
- 2 Murphy F.A. Veterinary Virology. / E.P.J Gibbs, M.C. Horzinek, M.J. Studdert, San Diego, Calif: Academic Press, 1999.
- 3 Diallo A. Morbillivirus group: genome organization and proteins // Veterinary Microbiology. – 1990. – Vol. 23. – P. 155-163.
- 4 Appel M., Sheffy B.E., Percy D.H., Gaskin J.M. Canine distemper virus in domesticated cats and pigs // American Journal of Veterinary Research, – 1974. – Vol. 35. – P. 803-806.
- 5 Deem S.L., Spelman L.H., Yates R.A., Montali R.J. Canine distemper in terrestrial carnivores: a review // Journal of Zoo and Wildlife Medicine. – 2000. – Vol. 31(4). – P. 441-451.

- 6 Thulin J.D., Granstrom D.E., Gelberg H.B., Morton D.G., French R.A., Giles R.C. Concurrent protozoal encephalitis and canine distemper virus infection in a raccoon (*Procyon lotor*) // *Vet. Rec.* – 1992. – Vol. 130(8). – P.162-164. doi: 10.1136/vr.130.8.162. PMID: 1566543.
- 7 Реутская Д.И. Парвовирусный энтерит собак: Эпизоотология, иммунология, профилактика и меры борьбы : дис. кандидата ветеринарных наук – Барнаул, 2003.
- 8 Михалишин В.В., Рыбаков С.С., Домский И.А., Борисов А.В., Метлин А.Е., Чепуркин А.В., Егоров А.А., Рябоконт А.А. Испытание иммуногенности и безвредности вирусвакцины против бешенства орального применения // *Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия КРС, Крейтцфельда-Якоба и другие прионные болезни, листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена* : Мат. межд. науч. практ. конф. – Покров, 2001. – С. 33-36.
- 9 Gröne A., Groeters S., Koutinas A., Saridomichelakis M., Baumgärtner W. Non-cytocidal infection of keratinocytes by canine distemper virus in the so-called hard pad disease of canine distemper // *Vet Microbiol.* – 2003. – Vol. 96(2). – P.157-63. doi: 10.1016/s0378-1135(03)00214-1. PMID: 14519333.
- 10 Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Никоноров Ю.М., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // *Вестник Башкирск. ун-та.* – 2012. – №1. – С. 59-60.

References

- 1 Syurin V.N., Samujlenko A.Ya., Solov'ev B.V., Fomin N.V. (2001) *Virusnye bolezni zhivotnyh* // Moskva: VNITIVP, 928 pp.
- 2 Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C., Studdert M.J. (1999) *Veterinary Virology*. San Diego, Calif: Academic Press, 1999.
- 3 Diallo A. (1990) Morbillivirus group: genome organization and proteins // *Veterinary Microbiology*, vol. 23, pp.155-163.
- 4 Appel M., Sheffy B.E., Percy D.H., Gaskin J.M. (1974) Canine distemper virus in domesticated cats and pigs // *American Journal of Veterinary Research*, vol. 35, pp. 803-806.
- 5 Deem S.L., Spelman L.H., Yates R.A., Montali R.J. (2000) Canine distemper in terrestrial carnivores: a review // *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, vol. 31, no. 4, pp. 441-451.
- 6 Thulin J.D., Granstrom D.E., Gelberg H.B., Morton D.G., French R.A., Giles R.C. (1992) Concurrent protozoal encephalitis and canine distemper virus infection in a raccoon (*Procyon lotor*). *Vet. Rec.*, vol. 130(8), pp. 162-164. doi: 10.1136/vr.130.8.162. PMID: 1566543.
- 7 Reutskaya D.I. (2003) *Parvovirusnyj enterit sobak: Epizootologiya, immunologiya, profilaktika i mery bor'by: diss. kandidata veterinarnykh nauk [Parvovirus enteritis in dogs: Epizootology, immunology, prevention and control measures: diss. candidate of veterinary sciences]* – Barnaul
- 8 Mihalishin V.V., Rybakov S.S., Domsnij I.A., Borisov A.V., Metlin A.E., Chepurkin A.V., Egorov A.A., Ryabokon' A.A. (2001) *Ispytanie immunogennosti i bezvrednosti virusvakciny protiv beshenstva oral'nogo primeneniya // Neiroinfekcii: beshenstvo, gubkoobraznaya encefalopatiya KRS, Krejtcfel'da-Yakoba i drugie prionnye bolezni, listerioz, bolezni' Aueski, bolezni' Teshena: Mat. mezhd. nauch. prakt. konf. [Testing the immunogenicity and safety of the oral rabies virus vaccine // Neuroinfections: rabies, bovine spongiform encephalopathy, Creutzfeldt-Jakob and other prion diseases, listeriosis, Aujeszky's disease, Teschen's disease: Mat. intl. scientific practical conf.]* Pokrov, pp. 33-36.
- 9 Gröne A., Groeters S., Koutinas A., Saridomichelakis M., Baumgärtner W. (2003) Non-cytocidal infection of keratinocytes by canine distemper virus in the so-called hard pad disease of canine distemper // *Vet Microbiol.*, vol. 96(2), pp.157-63. doi: 10.1016/s0378-1135(03)00214-1. PMID: 14519333.
- 10 Bikbulatova S.M., Chemeris D.A., Nikonorov Yu.M., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V., Vahitov V.A. (2012) *Sposoby detekcii rezul'tatov polimeraznoj cepnoj reakcii v rezhime real'nogo vremeni [Methods for real-time detection of polymerase chain reaction results]* *Vestnik Bashkirsk. un-ta*, no.1, pp. 59-60.

ИТ АУРУЫ ВИРУСЫН ДИАГНОСТИКАЛАУ ҮШІН SYBR GREEN I ФЛУОРЕСЦЕНТТІ БОЯҒЫШТЫ ҚОЛДАНАТЫН НАҚТЫ УАҚЫТТАҒЫ ПОЛИМЕРАЗДЫ ТІЗБЕКТІ РЕАКЦИЯ

М.К. Исакеев , Ж.Ч. Орозов , М.А. Ахмеджанов , С. А. Джээнбаева 

Қырғыз ғылыми-зерттеу институты. А. Дүйшеева, Бішкек қ., Қырғызстан

Аннотация: Нақты уақыттағы полимеразды тізбекті реакцияны (ПТР-РВ) қолдана отырып, жыртқыш оба диагнозы қойылды. ПТР-РВ жүргізу үшін sybr green I флуоресцентті бояғыш қолданылды, Бішкек қаласының маңында 106 ит ПТР-РВ көмегімен тексерілді. 106 иттің 10-ы сау және бақылау ретінде пайдаланылды. 96 иттен клиникалық үлгілер алынды, 87-ден етқоректілер обасының қоздырғышы анықталды және 9-ы теріс нәтиже берді. ПТР әдісі соңғы жылдары ауылшаруашылық және үй жануарларының жұқпалы ауруларын диагностикалау үшін ветеринарлық тәжірибеде және елдің ғылыми орталықтарында сәтті қолданылды. Ветеринарлық тәжірибеде және ғылымда жұқпалы ауруларды анықтауда ПТР қоздырғыш генінің болуын анықтауға мүмкіндік беретін стандартты процедура болып табылады. Жыртқыш оба кезінде ПТР әдісін қолдану қажетті процедура болып саналады, өйткені басқа әдістер аз сезімтал және аз тиімді. ПТР-РВ қолдану диагностиканы жеңілдетеді және классикалық нұсқадағы ПТР-ге қарағанда талдау уақытын үнемдейді. Сондықтан бүгінгі таңда біздің елімізде практикалық ветеринарлық диагностикаға ПТР-РВ енгізу өзекті болып саналады.

Түйін сөздер: жыртқыш оба; диагностика; ПТР-РВ; SYBR Green I; вирус; ит.

REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION USING SYBR GREEN I FLUORESCENT DYE TO DIAGNOSE CANINE DISTEMPER VIRUS

М.К. Isakeev , Zh.Ch. Orozov , M.A. Ahmedjanov , S.A. Dzheenbaeva 

Kyrgyz Scientific-Research Institute of Veterinary Medicine named after A. Duisheeva,
Bishkek city, Kyrgyzstan

Abstract: The canine distemper virus was diagnosed using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). For diagnostics with RT-PCR, the fluorescent dye SYBR Green I was used. Using RT-PCR, 106 dogs were tested in the vicinity of Bishkek and c. Bishkek. Of 106 dogs, 10 healthy dogs were used for controls. Clinical samples were obtained from 96 dogs, from 87 the causative agent of canine distemper virus was identified and 9 gave a negative result. In recent years, the PCR method has been successfully used in veterinary practice and in scientific centers of the our country to diagnose infectious diseases of agricultural and domestic animals. In veterinary practice and science, when determining infectious diseases, PCR is a standard procedure that allows you to determine the presence of the pathogen gene. With canine distemper virus, the use of the PCR method is considered a necessary procedure, since other methods are less sensitive and not very effective. The use of RT-PCR simplifies diagnostics and saves time for the analysis than PCR in the classic version. Therefore, today, the introduction of RT-PCR into practical veterinary medicine is considered relevant in our country.

Keywords: canine distemper virus; diagnostics; RT-PCR; SYBR Green I; virus; dog.