

УДК 636.09:616.98:578.82/83: 577.2:636.4

<sup>1</sup>М.П. СИТЮК, кандидат ветеринарних наук<sup>1</sup>Л.М. МУЗИКІНА<sup>1</sup>І.В. ГАЛКА, кандидат ветеринарних наук<sup>1</sup>С.А. НИЧИК, доктор ветеринарних наук<sup>2</sup>В.Г. СПИРИДОНОВ, доктор сільськогосподарських наук<sup>2</sup>С.Д. МЕЛЬНИЧУК, доктор біологічних наук<sup>1</sup>Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ<sup>2</sup>Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК НУБіП, м. Київ**РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ДНК ЦИРКОВІРУСУ СВИНЕЙ ДРУГОГО ТИПУ**

У статті наведені результати розробки та валідації методики полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для детекції ДНК цирковірусу свиней другого типу за міжнародними вимогами. Представлені показники визначення чутливості, межі виявлення, збіжності та специфічності методики, які свідчать про можливість її застосування з метою виявлення ДНК цирковірусу другого типу у біологічному або патологічному матеріалі від диких та домашніх свиней.

*Ключові слова:* цирковірус другого типу, ДНК, ПЛР у режимі реального часу, процедури валідації

Цирковірусна хвороба свиней - інфекційне захворювання відлучених поросят, що характеризується відставанням у рості й розвитку, ураженнями шкіри та респіраторним синдромом [1]. Збудником хвороби є ДНК-вмісний вірус, який, згідно з класифікацією Міжнародного комітету з таксономії, належить до роду *Circovirus* родини *Circoviridae*, яка включає вірус анемії курчат, цирковіруси свиней 1 та 2 типів (ЦВС-1 та ЦВС-2), цирковіруси папуг, голубів [2 - 6].

Важливою складовою у постановці діагнозу на цирковіроз є лабораторні методи діагностики. Остаточний діагноз на ЦВС-2 встановлюється на підставі виявлення вірусу у тканинах і органах поросят за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [2, 7 - 11], гібридизації *in situ* [9], «гніздової» ПЛР [12], методу флуоресціюючих антитіл (МФА), імунопероксидазним тестом [13 - 16], імуногістохімічно [2, 9, 17 - 19], методом ІФА [10, 12], електронної мікроскопії [12, 20], цитологічної гібридизації [19], тощо.

В Україні розроблена лише діагностична тест-система класичної ПЛР, щодо детекції ДНК цирковірусу свиней другого типу із обліком результатів аналізу електрофорезом в агарозному гелі [11].

Оскільки в Україні діагностика цирковірусної інфекції здійснюється за допомогою комерційних тест-систем, метою наших досліджень було розробити та провести валідацію методики виявлення ДНК цирковірусу свиней 2-го типу в біологічному або патологічному матеріалі (цільна кров, плазма крові, лімфоїдні органи) шляхом постановки якісної полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу відповідно до прописаних міжнародних стандартів.

**Матеріали і методи досліджень.** Нами на базі Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК НУБіП України було розроблено специфічні праймери, комплементарні нуклеотидній послідовності гену капсидного протеїну PCV-2 (GenBank № EU747125). В таблиці 1 представлені нуклеотидні послідовності праймерів та їхня характеристика. Варто зауважити, що зонд для детекції ампліфікації у реальному часі було мічено флуоресцентним барвником FAM, на 5'кінці олігонуклеотиду, та гасником флуоресценції BHQ1 – на 3'кінці. Відповідно для детекції внутрішнього контролю ПЛР зонд було мічено флуоресцентним барвником JOE. Склад реакції включав буфер для ПЛР (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3), 0,25 mM кожного дНТФ, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, по 10 pM кожного з праймерів (PCV-2-F, PCV-2-R, PRF, PRR), по 5 pM зондів (PCV-2P, PRP) та 0,5 одиниці Taq-ДНК полімерази. Умови реакції ампліфікації представлені в таблиці 2.

Таблиця 1

**Характеристика олігонуклеотидних праймерів для детекції ДНК цирковірусу другого типу та внутрішнього контролю ПЛР**

Назва праймеру	Нуклеотидна послідовність, 5'-3'	Призначення
PCV-2-F	GCCACAGCCCTAACCTATGA	Ампліфікація ЦВС-2
PCV-2-R	TCAGCCAAAGCTGATCCTT	
PCV-2P	FAM-CTACTCCTCCGCCATACAA-BHQ1	
PRF	ACGTGAACSTATTCAAGA	Ампліфікація ВКЗ
PRR	GACTGCAATGTCTCCGTATC	
PRP	JOE-ACCAATTCTGGAGGAACCGA-BHQ1	

Таблиця 2

**Умови ампліфікації ДНК цирковірусу другого типу**

№ п/п	Етапи	Температура, °С	Час, сек.	Кількість циклів
1	Початкова денатурація ДНК	95	300	1
2	Денатурація ДНК	95	20	45
	Відпалювання праймерів	55	20	
	Елонгація ДНК та вимірювання флуоресценції	72	20	

Підготовку дослідних зразків, виділення ДНК та ампліфікацію продуктів ПЛР проводили при використанні наступних приладів: система ампліфікації ДНК у реальному часі Rotor-Gene 6000Q, виробник «QIAGEN Hilden», Німеччина; центрифуги з охолодженням Z 32 НК та Z 216-МК, виробник «Hermle Labortechnik»; шафи біологічної безпеки (2 клас) LA2-4L1 та LA2-6L1, камера для ПЛР PCR-4A1 та бокс для приготування розчинів AVC-4D1, виробник ESCO; мішалка лабораторна магнітна RH basik-2, виробник «Ika

Werke»; центрифуга-міні вортекс FVL-2400N, виробник «BioSan»; шейкер лабораторний Vortex Genius-3, виробник «Ika Werke»; холодильник побутовий з морозильною камерою Атлант ХМ-6023; джерело безперервного живлення BNT-1000AP та KIN-3000 AP, виробник «Powerscom»; млин ножовий (блендер) лабораторний Grindomix GM 200, виробник «Retsch»; терези лабораторні механічні OHAUS 1400/1500, Польща; ваги електронні AXIS A500, Польща; дозатори піпеткові Eppendorf Research plus, одноканальні різного об'єму 100-1000, 20-200, 10-100, 2-20, 0,5-10 мкл, виробництва Німеччина; аспіратор з колбою-пасткою FTA-1, виробник «Bio San»; термостат шейкер (термоміксер) Komfort 5355, виробник «Eppendorf»; опромінювач бактерицидний (настінний) ОБН-150М, виробник ТзОВ «3-Уц «Медсервіс»; одноразові поліпропіленові мікроцентрифужні пробірки з кришками, об'ємом 1,5 см<sup>3</sup>, 0,6 см<sup>3</sup>; одноразові поліпропіленові пробірки для ампліфікації об'ємом 0,5 або 0,2 см<sup>3</sup> (залежно від марки ампліфікатора); одноразові наконечники для піпеток змінного об'єму з аерозольним бар'єром 10, 20, 100, 200, 1000 мкл; штативи для наконечників та мікропробірок об'ємом 1,5 см<sup>3</sup>, 0,5 см<sup>3</sup> або 0,2 см<sup>3</sup>.

При валідації методики полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для детекції ДНК цирковірусу свиней другого типу використовували наступний біологічний матеріал (таблиця 3).

Таблиця 3

**Перелік досліджуваного матеріалу для валідації методики визначення ДНК цирковірусу свиней другого типу методом ПЛР у режимі реального часу**

№ з/п	Назва досліджуваного матеріалу
1	Суспензія лімфоїдних органів дикого кабана, що не містить цирковірус свиней 2-го типу (Негативний біологічний матеріал - НБМ)
2	Суспензія лімфоїдних органів дикого кабана, що містить цирковірус свиней 2-го типу (Внутрішній контрольний матеріал - ВКМ)
3	Вірусмісна суспензія культури клітин СНЕВ, що містить вірус хвороби Тешена свиней
4	Вірусмісна суспензія культури клітин ВНК-21, що містить вірус хвороби Ауескі
5	Вірусомісна суспензія культури клітин MARK-145, що містить вірус РРСЄ Європейського генотипу
6	Вірусомісна суспензія культури клітин РК-15, що містить цирковірус свиней 1-го типу

Валідацію методики полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для детекції ДНК цирковірусу свиней другого типу проводили відповідно до стандартів [22-26] у вірусологічному секторі лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» Інституту ветеринарної медицини НААН України, що має рівень біобезпеки BSL 2, та акредитованої за міжнародним стандартом ISO-17025.

Експериментальні дослідження проводили у період з 14.04.2014 по 10.08.2014 року у три етапи із застосуванням стандартних операційних процедур, описаних у СОП-В.11.03-03.01-14, що розглянута Методичною комісією протокол № 1 від 04.07.2014 року та затверджена вченою радою ІВМ НААН протокол № 6 від 30.07.2014 року

**Результати досліджень та їх обговорення.** В основу методики детекції ДНК цирковірусу другого типу в біологічному матеріалі від домашніх та диких свиней покладено принцип проведення якісної полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу. Результат ампліфікації ДНК цирковірусу свиней другого типу реєструється на каналі флуоресценції FAM/Green, а результат ампліфікації внутрішнього контрольного зразку (ВКЗ) на каналі JOE/Yellow. ВКЗ використовується для контролю активності ензиму Таq-ДНК полімерази та запобіганню отримання хибнонегативних результатів.

Для оцінки придатності даної методики застосовували ряд окремих параметрів, що необхідні при валідації методики з якісного аналізу, а саме: межа виявлення (LOD) або чутливість; збіжність або повторюваність; специфічність або достовірність.

Експерименти з оцінювання придатності методу проводились співробітниками вірусологічного сектору НДНЦДХТ ІВМ НААН України та розробниками (М.П. Ситюк, Л.М. Музикіна, І.В. Галка, В.Г. Спиридонов, Л.М. Іщенко) в окремих робочих зонах: первинної обробки матеріалу, виділення ДНК, проведення ПЛР у реальному часі.

У дослідях використовували зразки біологічного та патологічного матеріалу та контролю: позитивний контроль (К+), негативний контроль (К-), внутрішній контрольний зразок (ВКЗ).

Оцінку результатів дослідження проводили за показниками первинного обліку контролів ПЛР, які повинні відповідати критеріям, що зазначені у таблиці 4.

Отримані результати досліджуваних контролів відповідають очікуваним значенням. Досліджувані зразки вважають позитивними, якщо значення Ct по каналу FAM/Green менше або дорівнює 38 (Ct ≤ 38), що свідчить про ампліфікацію гена, який кодує специфічну ділянку ДНК цирковірусу свиней другого типу. Зразок вважається негативним, якщо значення Ct по каналу FAM/Green відсутнє, а значення Ct по каналу JOE/Yellow (ампліфікація ВКЗ) менше або дорівнює 35 (Ct ≤ 35).

Таблиця 4

**Оцінка результатів аналізу контрольних точок ПЛР**

Контролі	Етап аналізу	Значення Ct по каналу FAM/Green		Значення Ct по каналу JOE/Yellow	
		очікуваний результат	отриманий результат	очікуваний результат	отриманий результат
К-	ампліфікація	відсутнє	відсутнє	≤ 35	24,74
К+	ампліфікація	≤ 30	26,56	≤ 35	25,45
ВКЗ	ампліфікація	відсутнє	відсутнє	≤ 35	24,71

**Результати визначення чутливості методу (LOD).** Для визначення межі виявлення було взято зразок суспензії лімфоїдних органів дикого кабана, що містив цирковірус свиней 2-го типу. У даному зразку було визначено кількість вірусних геном-еквівалентів (ГЕ/см<sup>3</sup>), що становило 5x10<sup>5</sup> ГЕ/см<sup>3</sup>, який використовували у 5 різних концентраціях. На кожну концентрацію проводили аналіз не менше 10 незалежних реплікатів (повторів). Вимірювання реплікатів на різних рівнях проводили у випадковому порядку. Результати з межі виявлення наведені у таблиці 5.

Визначення межі виявлення цирковірусу свиней 2-го типу

Кількість геномних еквівалентів		5x10 <sup>5</sup> ГЕ/см <sup>3</sup>	5x10 <sup>4</sup> ГЕ/см <sup>3</sup>	5x10 <sup>3</sup> ГЕ/см <sup>3</sup>	5x10 <sup>2</sup> ГЕ/см <sup>3</sup>	5x10 <sup>1</sup> ГЕ/см <sup>3</sup>
Значення Ct у 10 повторах	1	24,75	28,49	35,73	0	0
	2	24,63	29,66	34,68	36,18	0
	3	25,13	28,54	34,78	37,22	0
	4	24,75	29,03	0	0	0
	5	24,47	29,22	0	0	0
	6	25,38	28,76	0	36,15	0
	7	25,84	28,67	35,27	0	0
	8	24,7	29,68	0	0	0
	9	25,24	28,62	0	0	0
	10	24,85	28,64	0	0	0
Середня Ct		24,974	28,931	35,115	36,517	0
SD		0,4181	0,4487	0,4843	0,6093	0
CV		1,674	1,5509	1,3792	1,6685	0
Кількість реплікатів		10	10	10	10	10
Позитивні/ негативні результати		10/0	10/0	4/6	3/7	0/10
Аналітична чутливість, %		100	100	40	30	0

Показники таблиці 5 вказують про те, що довірчий інтервал аналітичної чутливості методу за концентрації 5x10<sup>5</sup> ГЕ/ см<sup>3</sup> та 5x10<sup>4</sup> ГЕ/ см<sup>3</sup> становив 100 %. Однак за концентрації 5x10<sup>3</sup> ГЕ/ см<sup>3</sup> та 5x10<sup>2</sup> ГЕ/ см<sup>3</sup> довірчий інтервал аналітичної чутливості методу становив 40 % та 30 % відповідно, а за концентрації 5x10<sup>1</sup> ГЕ/ см<sup>3</sup> чутливість була відсутньою. Тобто межа виявлення (**LOD**) досліджуваної тест-системи становить 5x10<sup>4</sup> ГЕ/см<sup>3</sup>.

**Аналіз збіжності результатів визначення ДНК цирковірусу свиней 2-го типу.** Збіжність результатів досліджень вираховували шляхом декількох повторів постановки якісної ПЛР-РЧ за одних умов з визначенням коефіцієнту варіації (CV %), який оцінювали за показниками Ct (рис. 1, табл. 6).

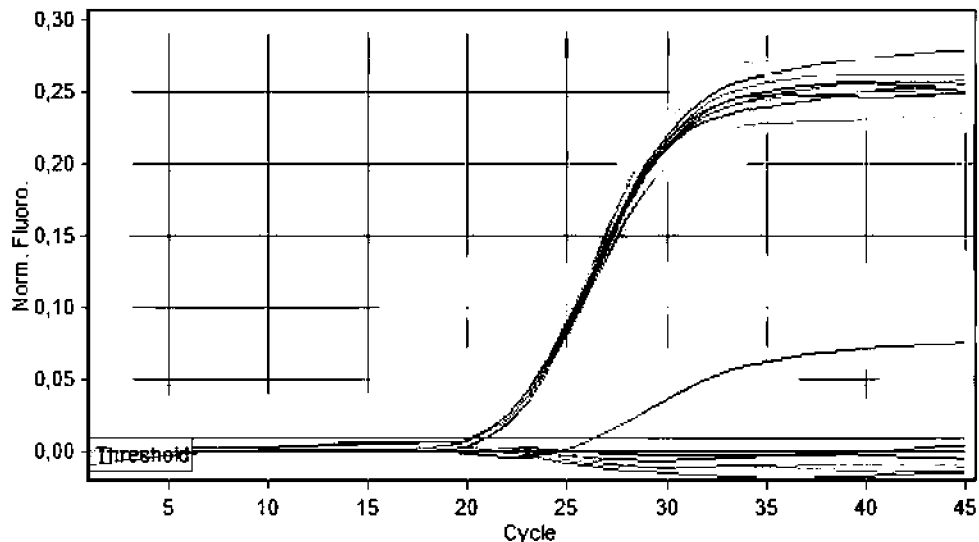


Рис. 1. Результати ампліфікації ДНК цирковірусу другого типу у досліджуваних зразках щодо визначення збіжності отриманих результатів по каналу FAM/Green

Таблиця 6

Оцінка збіжності результатів виявлення ДНК цирковірусу свиней 2-го типу методом ПЛР у режимі реального часу

Кількість повторів досліджуваного матеріалу	Ct, канал FAM	Ct <sub>сер</sub>	% SD	% CV	Прийнятне значення стандартного відхилення для методу (SDv)	Прийнятне значення коефіцієнту варіації (% CVv)
1	21,03	20,735	0,25	1,20	Не більше 0,5	2,41
2	21,14					
3	20,51					
4	20,68					
5	20,86					
6	20,84					
7	20,69					
8	20,32					
9	20,77					
10	20,51					

Нами було проведено порівняння розрахованого коефіцієнта варіації (%CV) значень Ct для серії досліджень зразка в один і той же час з прийнятним значенням коефіцієнта варіації (%CVv), яке отримували на основі валідованого значення стандартного відхилення для даного методу (%SDv для методу не більше 0,5). Прийнятне значення коефіцієнту варіації розраховували за формулою (1):

$$\%CVv = 100 * (\%SDv / Ct_{\text{ср}}) = 100 * (0,5 / Ct_{\text{ср}}) \quad (1)$$

Для визначення збіжності було використано біологічний матеріал (Суспензія лімфоїдних органів дикого кабана, що містить цирковірус свиней 2-го типу), який досліджували у 10 повторах (табл. 6).

За даними наведеними у таблиці 6 мінімальне значення Ct складало 20,32 та максимальне - 21,14, а середнє - 20,735. Подальші розрахунки показали, що валідоване значення стандартного відхилення (SD) в наших дослідках становило 0,25 %, що удвічі нижче від максимально допустимого рівня прийнятного значення стандартного відхилення для методу (SD ≤ 0,5). Коефіцієнт варіації (% CV) при постановці дослідку становить 1,2 %, що також удвічі нижче від прийнятного значення коефіцієнту варіації для методу (CVv ≤ 2,41).

В результаті валідації методики отримані результати, де % CV ≤ % CVv, що свідчить про збіжність результатів якісного виявлення ДНК цирковірусу другого типу.

**Визначення специфічності методу.** Специфічність методики визначали шляхом ампліфікації екстрагованої ДНК з біологічного або патологічного матеріалу та гібридаційно-флуоресцентної детекції продуктів ампліфікації в режимі реального часу. Результат ампліфікації ДНК цирковірусу свиней 2-го типу враховували на каналі FAM/Green, результат ампліфікації екзогенного ВКЗ - на каналі флуоресценції JOE/Yellow.

Специфічність методу визначали експериментально при використанні позитивного та негативного біологічних матеріалів щодо цирковірусу свиней 2-го типу, а також, трьох сторонніх збудників вірусних захворювань свиней (хвороби Тешена, Ауескі, репродуктивно-респіраторного синдрому свиней) та одного спорідненого збудника (цирковірус свиней 1-го типу), які поєднували у співвідношенні 1:1 з позитивним внутрішнім контрольним матеріалом (+ВКМ) та негативним біологічним матеріалом (НБМ). Результати дослідження наведені у представлені на рис. 2 та у таблиці 7.

Результати таблиці 7 вказують на те, що у зразках біологічного матеріалу, що містили сторонні віруси (хвороби Тешена, хвороби Ауескі, репродуктивно-респіраторного синдрому свиней, цирковірусу 1-го типу) не було виявлено ДНК цирковірусу другого типу. У той же час у зразках біологічного матеріалу, що містив цирковірус другого типу було виявлено специфічну ДНК.

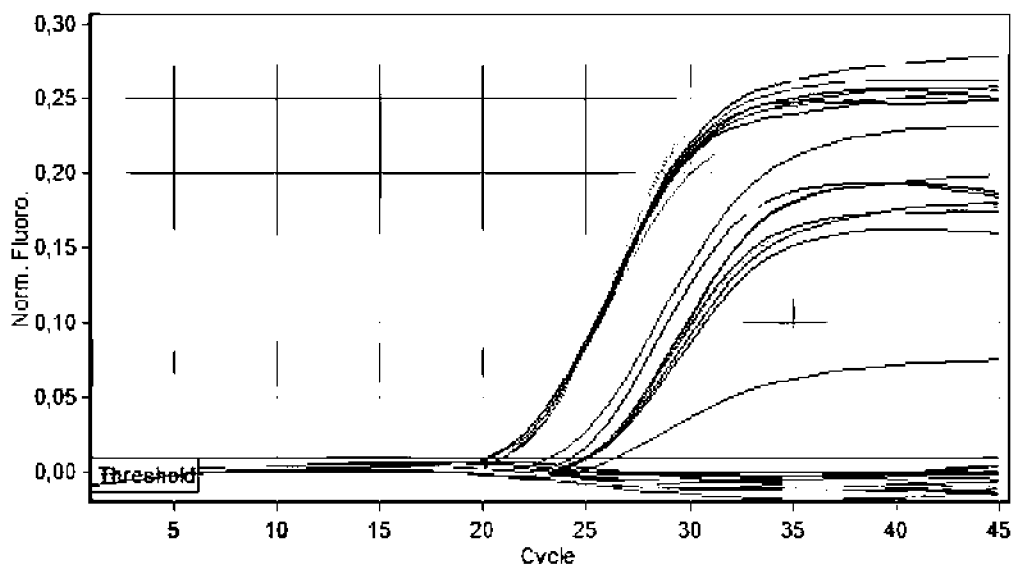


Рис. 2. Результати ампліфікації ДНК цирковірусу другого типу у досліджуваних зразках щодо визначення специфічності методики

Таблиця 7.

**Визначення специфічності методики**

№ з/п	Вид та характеристика досліджуваного матеріалу	Кількість зразків	Результати аналізу щодо виявлення ДНК цирковірусу другого типу	
			позитивні	негативні
1	2	3	4	5
1	Суспензія лімфоїдних органів дикого кабана, що не містить цирковірус свиней 2-го типу (Негативний біологічний матеріал - НБМ)	5	0	5
2	Суспензія лімфоїдних органів дикого кабана, що містить цирковірус свиней 2-го типу (Внутрішній контрольний матеріал - ВКМ)	10	10	0
3	Вірусвмісна суспензія культури клітин СНЕВ, що містить вірус хвороби Тешена свиней +НБМ	3	0	3
4	Вірусвмісна суспензія культури клітин СНЕВ, що містить вірус хвороби Тешена свиней +ВКМ	3	3	0

1	2	3	4	5
5	Вірусвмісна суспензія культури клітин ВНК-21, що містить вірус хвороби Ауескі свиней + НБМ	3	0	3
6	Вірусвмісна суспензія культури клітин ВНК-21, що містить вірус хвороби Ауескі свиней + ВКМ	3	3	0
7	Вірусвмісна суспензія культури клітин MARK-145, що містить вірус РРСС Європейського генотипу + НБМ	3	0	3
8	Вірусвмісна суспензія культури клітин MARK-145, що містить вірус РРСС Європейського генотипу + ВКМ	3	3	0
9	Вірусвмісна суспензія культури клітин РК-15, що містить цирковірус свиней 1-го типу+ НБМ	3	0	3
10	Вірусвмісна суспензія культури клітин РК-15, що містить цирковірус свиней 1-го типу+ ВКМ	3	3	0

За результатами проведених досліджень встановлено відсутність неспецифічних реакцій зі штамами гетерологічних вірусів, що свідчить про специфічність методу.

Для оцінки достовірності даної методики нами було також проведено міжлабораторне порівняння з Українською лабораторією якості та безпеки продукції АПК (УЛЯБП АПК).

При цьому використовували зразки біологічного матеріалу (плазма крові свиней), відібраного в господарстві «Черкаська м'ясна компанія», Черкаська обл., Лисянський р-н, с Мар'янівка.

Результати міжлабораторного порівняння наведені в таблиці 8.

Таблиця 8

**Результати міжлабораторного порівняння виявлення ДНК цирковірусу свиней 2-го типу методом ПЛР у реальному часі**

Зразок	ІВМ НААН	УЛЯБП АПК
1	позитивний	позитивний
2	позитивний	позитивний
3	позитивний	позитивний
4	позитивний	позитивний
5	позитивний	позитивний
6	негативний	негативний
7	негативний	негативний
8	негативний	негативний
9	негативний	негативний
10	негативний	негативний

За результатами проведених досліджень у зазначених лабораторіях виявлено відповідність отриманих результатів.

**Висновок.** Отже, у результаті проведеної роботи було встановлено, що всі досліджені параметри валідації якісного методу визначення ДНК цирковірусу свиней 2-го типу методом ПЛР у реальному часі відповідають міжнародним вимогам (ISO 17025), що гарантує отримання точних та достовірних результатів.

**У перспективах подальших наукових досліджень** є необхідність у розробці та валідації кількісного методу визначення ДНК цирковірусу свиней 2-го типу методом ПЛР у реальному часі задовольняють міжнародним вимогам (ISO 17025). Запропонована методика буде рекомендована свинарським господарствам для проведення моніторингу та контролю за розповсюдженням цирковірусної інфекції.

**Список використаної літератури.**

- Музиченко І. Цирковірусна інфекція свиней / І. Музиченко // Прибуткове свинарство. – 2012. – № 2. – С. 69-73.
- Орлянкин Б. Г. Цирковірусная инфекция свиней и меры борьбы с ней / Б. Г. Орлянкин // Ветеринария с.-х. животных. – 2005. – № 2. – С. 18–20.
- Блоцька О. Ф. Цирковірусна інфекція свиней / О. Ф. Блоцька // Вет. медицина України. – 2008. – № 12. – С. 21–22.
- Инфекционная патология животных : в 2 т. / под ред. А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьева, Е. А. Непоклонова, Е. С. Воронина. – М. : ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т. 1. – С. 886-888.
- Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs / Fenaux M., Oprriessing T., Halbur P. G., Meng X. J. // J. of Virology. – 2003. – Vol. 77. – P. 11232-11234.
- ИФА для выявления антител к цирковірусу свиней второго типа / М. А. Шкаева, В. В. Цибезов, О. А. Верховский [и др.] // Ветеринария. – 2005. – № 9. – С. 20–23.
- Оптимизация полимеразной цепной реакции для идентификации генома цирковірусной инфекции свиней / Малооголовкин А. С., Надточей Г. А., Жигалева О. Н. [и др.] // Ветеринарная патология. – 2007. – № 2. – С. 49–51.
- Карташов С. Н. Морфологические изменения в миокарде при цирковірусной инфекции у свиней / С. Н. Карташов, А. М. Ермаков, А. Г. Ключников // Ветеринария Кубани. – 2008. – № 6. – С. 13–15.
- Орлянкин Б. Г. Цирковірусная инфекция свиней / Б. Г. Орлянкин, Т. И. Алипер, Е. А. Непоклонов // Ветеринария. – 2002. – № 11. – С. 48-51.
- Малооголовкин А. С. Биологические и генетические характеристики цирковірус свиней : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.06 «Вирусология», 03.00.23 «Биотехнология» / Малооголовкин А. С. – Покров, 2009. – 27 с.

11. Герілович А.П. Експериментальне і теоретичне обґрунтування та розробка засобів епізоотологічного моніторингу, діагностики вірусних хвороб тварин та молекулярно-генетичного типування їх збудників (ортоміксо-, параміксо-, герпес-, цирко- та пестівірусна інфекції) : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра вет. наук : спец. 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія» / А.П. Герілович. – Х., 2011. – 42 с.
12. Малоголовкин А. С. Выделение цирковируса свиней 2-го типа от поросят с синдромом мультисистемного истощения отъемышей / А. С. Малоголовкин, Г. А. Надточей, Д. В. Колбасов // Ветеринарный врач. – 2009. – № 2. – С. 27–30.
13. Декларац. пат. u201309587 Україна, МПК G01N 33/536, А61К 39/42. Імунопероксидазний тест для вірусологічної діагностики цирковірусної інфекції свиней / М. П. Ситюк, В. А. Байдалюк, В. І. Білокінь, С. А. Нічик. – № 89398 ; заявл. 31.07.13 ; опубл. 25.04.14, Бюл. № 8. – 4 с.
14. Методичні рекомендації застосування імунопероксидазного тесту для вірусологічної та серологічної діагностики цирковірусної інфекції свиней / [М. П. Ситюк, І. В. Артеменко, В. І. Білокінь, Л. В. Осмоловська]. – Ніжин : ПП Лисенко М. М., 2014. – 28 с.
15. Fort de Puig M. Characterization of Immune Responses to Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Infection and Vaccination in Pigs. – Bellaterra : Facultat de veterinaria de Barcelona, 2009. – 149 p.
16. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease / P. Meerts, G. Misinzo, D. Lefebvre [et al.] // BMC Veterinary Research. – 2006. – Vol. 2. – P. 6.
17. Дрю Т. Цирковирусы свиней / Тревор Дрю // Ветеринария с.-х. животных. – 2006. – № 12. – С. 21–22.
18. Малоголовкин А. С. Проблема цирковірусних інфекцій в патології животних і человека / А. С. Малоголовкин // Веткорм. – 2008. – № 2. – С. 30–31.
19. Гречухин А. Н. Особенности проявления цирковірусной инфекции свиней и ее специфическая профилактика / А. Н. Гречухин // Ветеринария Кубани. – 2010. – № 1. – С. 9–12.
20. Респираторная болезнь на свиномкомплексах Сибири: диагностика симптоматика, патоморфология / В. Н. Афонюшкин, С. В. Леонов, С. И. Прудников, Е. И. Рябчикова // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2007. – № 4. – С. 12–13.
21. Малоголовкин А. С. Биологические и генетические характеристики цирковірусів свиней : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.06 «Вирусология», 03.00.23 «Биотехнология» / Малоголовкин А. С. . – Покров, 2009. – 27 с.
22. The Fitness for Purpose of Analytical Methods : A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics [Electronic resource] / EURACHEM Working Group. – Mode of access : <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>. – Title from the screen.
23. Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies : (Technical Report) / W. Horwitz ; International Union of Pure and Applied Chemistry // Pure and Applied Chemistry. – 1995. – Vol. 67, N 2. – P. 331-343.
24. Костюк С. А. Критерии внутрилабораторного контроля качества молекулярно-биологических исследований [Электронный ресурс] / С. А. Костюк. – Режим доступа : <http://urobel.uroweb.ru/article/id-20>. – Заглавие с экрана.
25. Валидація біоаналітичного методу : метод. рекомендації / Міністерство здравоохранения Украины, ГП «Государственный экспертный центр». – Киев, 2013. – 35 с.
26. Загальні вимоги до компетентності випробувальних та комплектувальних лабораторій (ISO 17025:2005, IDT) : ДСТУ ISO 17025:2005. – [Чинний від 2007-07-01]. – К. : Держспоживстандарт України, 2007. – VI, 25 с. ; 29 см. – (Національний стандарт України).

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ДНК ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ ВТОРОГО ТИПА / Ситюк Н.П., Музикина Л.Н., Галка И.В., Нычик С.А., Спырыдонов В.Г., Мельничук С.Д.**

*В статье приведены результаты разработки и валидации методики полимеразной цепной реакции у режиме реального времени для детекции ДНК цирковірусів свиней второго типа по международным требованиям. Представлены показатели определения чувствительности, границы выявления, воспроизведения и специфичности метода свидетельствуют о возможности его применения с целью выявления ДНК цирковірусів второго типа у биологическом или патологическом материале от диких и домашних свиней.*

*Ключевые слова: цирковірус второго типа, ДНК, тест-система ПЦР в режиме реального времени, процедуры валидации*

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN REAL TIME FOR DETECTION DNA CIRCOVIRUS TYPE II / M. P. Sytiuk, L. M. Muzykina, I. V. Halka, S. A. Nychyk, V. G. Spirydonov, S. D. Melnychuk**

*The results of the development and validation of qualitative polymerase chain reaction in real-time method for the detection of DNA of porcine circovirus type 2 by international regulations are presented in the article. On the basis of Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products NULES of Ukraine has developed specific primers complementary nucleotide sequence capsid protein gene of PCV-2 (GenBank № EU747125). Validation of qualitative polymerase chain reaction in real-time method for the detection of DNA of porcine circovirus type 2 carried out in the virological sector of the laboratory of "Research Training Center diagnostics» Institute of Veterinary Medicine of NAAS of Ukraine that has BSL biosafety level 2, and is accredited by the international standard ISO – 17 025. Experiments were carried out in the period from April, 14, 2014 to August, 10, 2014, in three stages using standard operating procedures described in SOP-V.11.03-03.01-14 that is approved by Methodical Commission by protocol № 1 of July, 4, 2014, and approved by the Academic Council of IVM NAAS of Ukraine by protocol № 6 from July, 30, 2014. The methodology for detecting DNA of porcine circovirus type 2 in the biological material from domestic and wild pigs using qualitative polymerase chain reaction in real time, which is used to assess a number of separate parameters needed in the validation of the method of qualitative analysis, they are sensitivity, repeatability, specificity.*

*To determine the sensitivity of the sample suspensions of lymphoid organs of wild boar containing porcine circovirus type 2 were taken. This sample was defined by the number of viral genome equivalents (GE / cm<sup>3</sup>), which was 5x10<sup>5</sup> GE / cm<sup>3</sup>, which was used in 5 different concentrations. It was performed at least 10 independent replicates (repetitions) at each concentration analysis. Measurement replicates at different levels were conducted in random order. The confidence limit of analytical sensitivity of the method for concentration 5x10<sup>5</sup> GE / cm<sup>3</sup> and 5x10<sup>4</sup> GE / cm<sup>3</sup> was 100%. However, in the concentration 5x10<sup>3</sup> GE / cm<sup>3</sup> and 5x10<sup>2</sup> GE / cm<sup>3</sup> CI analytical sensitivity of the method was 40% and 30% respectively, and the concentration 5x10<sup>1</sup> GE / cm<sup>3</sup> sensitivity was absent. That is the limit of detection (LOD) of the studied test-system is 5x10<sup>4</sup> GE / cm<sup>3</sup>.*

*To determine the repeatability the biological material was used (suspensions of lymphoid organs of wild boar containing porcine circovirus type 2), studied in 10 repetitions, where the minimum value is 20.32 Ct; maximum - 21.14; average - 20,735. Validated value of the standard*

deviation (SD) was 0.25%, which is twice lower than the maximum level of acceptable values for the standard deviation method ( $SD \leq 0,5$ ). Coefficient of variation (% CV) was 1.2%, also lower than twice the acceptable coefficient of variation for the method ( $CV \leq 2,41$ ), indicating that the convergence results qualitative detection of DNA porcine circovirus type 2.

The specificity of the method was determined by amplification of extracted DNA from the biological material and hybridization-fluorescence detection of amplification products in real-time channel FAM / Green, and the result of amplification of exogenous SCC - channel fluorescence JOE / Yellow.

The specificity of the method was determined experimentally using positive and negative biological materials for porcine circovirus type 2 and three pathogens of swine viral diseases (Teschen disease, Aujeszky's disease, Porcine reproductive and respiratory syndrome) and other cognate pathogen (porcine circovirus type 1), which are combined in a 1:1 ratio of positive internal control material (CMEs +) and negative biological material (NBM). In samples of biological material containing extraneous viruses (Teschen disease, Aujeszky's disease, Porcine reproductive and respiratory syndrome, porcine circovirus type 1) was not detected DNA of porcine circovirus type 2. At the same time, in samples of biological material containing porcine circovirus type 2 specific DNA was detected.

Values of determining the sensitivity, detection limits, convergence and specificity of methods that indicate the possibility of its use to identify DNA porcine circovirus type 2 in biological or pathological material from wild and domestic pigs are presented.

*Key words: porcine circovirus type 2, DNA, qualitative PCR in real time, validation procedures.*

**Рецензент:** доктор ветеринарних наук **В. В. Уховський**

Рукопис надійшов 12.09.2014 р.