

8. Panova, I.E. & Drozdova, E.A. (2014). *Uveity: rukovodstvo dlya vrachey [Uveitis: a guide for physicians]*. Moscow: ООО «Izdatelstvo «Meditsinskoe informatsionnoe agenstvo» [in Russian].
9. Senchenko, N.Ya., Schuko, A.G. & Malyshev, V.V. (2010). *Uveity: rukovodstvo [Uveitis: a Guide]*. Moscow: GEOTAR-Media [in Russian].
10. Chumachenko, V.E., Serdyuk, A.M., Serdyuk, N.A. & Chumachenko, V.V. (1990). *Oprezhenie estestvennoy rezistentnosti i obmena veshchestv u sel'skohozyaystvennykh zhivotnykh [Determination of natural resistance and metabolism in farm animals]*. Kyiv: Urozhay [in Russian].
11. Meyer, D. & Harvi, Dzh. (2007). *Veterinarnaya laboratornaya meditsina. Interpretatsiya i diagnostika [Veterinary laboratory medicine. Interpretation and diagnosis]*. Moscow: Sofion [in Russian].
12. Cheredeev, A.N. & Kovalchuk, L.V. (1989). Kletochnyie i molekulyarnyye aspekty immunnykh protsessov [Cellular and molecular aspects of immune processes]. *Itogi nauki i tekhniki. Ser. Immunologiya – The results of science and technology. Ser. Immunology*, 19, 238.

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

**МУЗИКІНА Л.М.**, e-mail: loramuzykina@i.ua,  
**ГАЛКА І.В.**, канд. вет. наук, e-mail: ptica2005@ukr.net,  
**СИТЮК М.П.**, д-р вет. наук, e-mail: snp1978@ukr.net,  
**НИЧИК С.А.**, д-р вет. наук, e-mail: ivm\_naam@ukr.net  
*Інститут ветеринарної медицини НААН*  
**ЩЕНКО Л.М.**, канд. вет. наук, e-mail: ischenko\_lm@ukr.net,  
**СПИРИДОНОВ В.Г.**, д-р с-г. наук, e-mail: spyrydonov@ukr.net  
*Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК НУБіП*  
**ВАСИЛЬКІВ О.Б.\***, e-mail: ternopil.rdlvm@gmail.com  
*Тернопільська регіональна державна лабораторія ветеринарної медицини*

## **РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЯВЛЕННЯ РНК ВІРУСУ ХВОРОБИ ТЕШЕНА МЕТОДОМ ПЛР В РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ**

*У статті наведені результати розробки та валідації методики виявлення РНК вірусу хвороби Тешена методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу. Специфічні праймери розроблені на основі аналізу сиквенсів українських ізолятів. Представлені результати визначення чутливості, збіжності специфічності та достовірності методики, які свідчать про можливість її застосування з метою виявлення РНК вірусу хвороби Тешена у матеріалі від домашніх і диких свиней.*

**Ключові слова:** вірус, хвороба Тешена, валідація, ПЛР в режимі реального часу.

**Вступ.** Ензоотичний енцефаломієліт свиней (хвороба Тешена) – гостра контагіозна інфекційна хвороба свиней, яка характеризується ознаками ураження центральної нервової системи (негнійний енцефаломієліт і паралічі).

---

\* Пошукач

Хворіють домашні та дикі свині, переважно у віці 2–10 місяців. Джерелом інфекції є вірусоносії в інкубаційний період і латентно хворі свині [1–3].

Про хворобу Тешена свиней вперше повідомив Трефні в 1930 р., який діагностував цю хворобу в містечку Тешен (Чехія) на кордоні з Польщею, а в 1933 р. Клобук детально її описав [4].

В Україні В.П. Романенко вперше діагностував хворобу Тешена в Закарпатській області в 1971 р. [5–7]. Ним були вивчені біологічні, фізико-хімічні, морфологічні, антигенні властивості виділених ізолятів ентеровірусів свиней і розроблена їхня класифікація [8].

Сучасні дослідження з вивчення вірусу ензоотичного енцефаломієліту свиней проводять в Японії (2004), Литві (2007), Чеській Республіці (2009), США, Китаї та Італії (2010) [9–14].

Згідно вимог МЕБ, діагноз на хворобу Тешена свиней ставлять на підставі епізоотичних даних, клінічних ознак, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень [15].

На перший план виходять сучасні експресні лабораторні методи досліджень, а саме ПЛР та ІФА [16].

В Україні для лабораторної діагностики ензоотичного енцефаломієліту свиней використовується лише класична ПЛР з детекцією результатів в електрофорезному гелі [17]. Попередньо співавторами були розроблені праймери, які специфічні для *Teschoviruses*, згідно аналізу нуклеотидних послідовностей, що кодують капсидний білок VP1 одинадцяти серотипів [18, 19].

Враховуючи вище згадане, **метою** нашої **роботи** було розробити та провести валідацію за міжнародними вимогами методики виявлення РНК вірусу ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней у біологічному та патологічному матеріалі за допомогою ПЛР у режимі реального часу для її подальшого використання в лабораторній діагностиці.

**Матеріали і методи досліджень.** Специфічні олігонуклеотидні праймери розроблені авторським колективом на основі аналізу сиквенсів українських ізолятів і кодують білок VP1 тешовірусів 1 серотипу. Слід зазначити, що зонд для детекції ампліфікації кДНК вірусів хвороби Тешена в реальному часі мічений флуоресцентним барвником FAM на 5'кінці олігонуклеотиду та гасником флуоресценції BHQ1 на 3'кінці, а для детекції внутрішнього контролю (ген PRP) – мічений флуоресцентним барвником JOE. В табл. 1 представлена нуклеотидна послідовність та призначення праймерів.

Технологічний процес постановки ПЛР складається з екстракції нуклеїнових кислот з біологічного матеріалу, ампліфікації та обліку результатів. Так як вірус хвороби Тешена РНК-вмісний, то після етапу виділення РНК з матеріалу застосовується ще один етап – зворотна транскрипція, яка забезпечує видозмінення РНК в молекулу комплементарної ДНК (кДНК).

Таблиця 1

**Характеристика олігонуклетидних праймерів для детекції кДНК вірусу хвороби Тешена і внутрішнього контролю ПЛР**

Назва праймеру	Нуклеотидна послідовність, 5'-3'	Призначення
PTV-1-F	TCTGTTGCTGTGAGGGTAATG	Ампліфікація PTV-1
PTV-1-R	AGTCTTGTGCCTGTTCTATGG	
PTV-1P	FAM-ATTGTTAAGCCATCCAAACACTCTGTGC-BHQ1	
PRP-F	ACGTGAACCTATTCAAGA	Ампліфікація ВКЗ
PRP-R	GACTGCAATGTCCTCCGTATC	
PRP-P	JOE-ACCAATTCTGGAGGAACCGA-BHQ1	

Для виділення РНК ми використовували комерційні комплекти «РИБО-преп» та «РИБО-сорб», а для проведення зворотної транскрипції – комерційний комплект «РЕВЕРТА-L» (AmpliSens, Росія) згідно інструкцій виробника.

Для постановки ПЛР використовували реакційну суміш, яка включала наступні компоненти:

1 – *Мастер-мікс* (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3), 0,25 mM кожного дНТФ/дУТФ, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, по 10 пМ кожного з праймерів (PTV-1-F, PTV-1-R, PRP-F, PRP-R), по 5 пМ зондів (PTV-1P, PRP-P);

2 – *Ензім-мікс* (0,5 одиниці Taq-ДНК полімерази; 0,1 одиниця урацил-ДНК-глікозилази ( УДГ)).

До реакційної суміші додавали 5 мкл кДНК досліджуваного матеріалу.

Крім того, при постановці ПЛР у режимі реального часу використані контрольні зразки: ПКЗ – позитивний контрольний зразок; НКЗ – негативний контрольний зразок; ВКЗ – внутрішній контрольний зразок, який контролює якість виділеної РНК і попереджає отримання псевдонегативних результатів.

Умови реакції ампліфікації представлені в табл. 2.

Таблиця 2

**Умови ампліфікації кДНК вірусу хвороби Тешена**

№ з/п	Етапи	Температура, °C	Час	Кількість циклів
1	Активация УДГ	50	5 хв	1
2	Початкова денатурація кДНК	95	5 хв	1
3	Денатурація кДНК	95	20 с	45
	Відпалювання праймерів	56	20 с	
	Елонгація кДНК	72	20 с	

При визначенні чутливості, збіжності, специфічності та достовірності методики виявлення РНК вірусу хвороби Тешена методом ПЛР у режимі реального часу використовували біологічний матеріал, зазначений в табл. 3.

Валідацію методики полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для детекції РНК вірусу ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней проводили в період з 02.06.2016 по 12.08.2016 року у вірусологічному секторі лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» Інституту ветеринарної медицини НААН, яка акредитована за міжнародним стандартом ISO-17025, із застосуванням рекомендацій ОІЕ

Validation Guidelines 2014 – 3.6.3 «Development and optimisation of Nucleic acid detection assays» [20].

Таблиця 3

**Перелік досліджуваного матеріалу для валідації методики виявлення РНК вірусу хвороби Тешена свиней методом ПЛР у режимі реального часу**

№ з/п	Назва досліджуваного матеріалу
1	Культура клітин СНЕВ, що не містить вірус хвороби Тешена (негативний біологічний матеріал – НБМ)
2	Вірус хвороби Тешена – штам «Березнянський – 652» (позитивний біологічний матеріал – ПБМ)
3	Вірус хвороби Ауескі – штам «Петриківський-2006»
4	Цирковірус свиней 2 типу – штам « <i>Stoon 1010</i> »
5	Вірус репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (PPCS) Європейського генотипу – штам « <i>Lelystad</i> »

**Результати досліджень та їх обговорення.** При проведенні лабораторної діагностики ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу для виявлення РНК вірусу в біологічному або патологічному матеріалі від домашніх та диких тварин використовують проби фекалій, ректальні змиви, головний та спинний мозок, кишківник, лімфатичні вузли, мигдалини, в лабораторних умовах – віруссмісну культуральну рідину.

В основу методики покладено виділення в досліджуваній пробі РНК вірусу хвороби Тешена, отримання кДНК, ампліфікацію специфічної ділянки кДНК за використання специфічних олігонуклеотидних праймерів за допомогою ферменту Таq-полімерази.

При проведенні досліджень використана система ампліфікації у реальному часі «Rotor-Gene Q», виробник «QIAGEN Hilden» (Німеччина).

Результат ампліфікації РНК вірусу хвороби Тешена реєстрували за барвником FAM (канал Green), а результат ампліфікації внутрішнього контрольного зразку (ВКЗ) – за барвником JOE (канал Yellow).

Облік результатів ПЛР аналізу проводили за наявності або відсутності перетину кривої флуоресценції з встановленою на відповідному рівні пороговою лінією, що відповідає наявності або відсутності значення порогового циклу  $C_t$ .

Результати аналізу вважаються достовірними, якщо значення  $C_t$  FAM позитивного контрольного зразку менше або дорівнює 30 ( $C_t \leq 30$ ), і відсутне значення  $C_t$  негативного контрольного зразку (НКЗ), також значення  $C_t$  JOE всіх досліджуваних зразків менше або дорівнює 35 ( $C_t \leq 35$ ). Оцінка отриманих результатів показників первинного обліку контролів ПЛР повинна відповідати критеріям, що зазначені у табл. 4.

## Оцінка результатів аналізу контрольних точок ПЛР

Контролі	Етап аналізу	Значення Ct FAM /Green		Значення Ct JOE/Yellow	
		очікуваний результат	отриманий результат	очікуваний результат	отриманий результат
К- (НКЗ)	ампліфікація	відсутнє	відсутнє	відсутнє	відсутнє
К+ (ПКЗ)	ампліфікація	≤ 30	15,20	відсутнє	відсутнє
В- (ВКЗ)	виділення РНК	відсутнє	відсутнє	≤ 35	24,77

Отримані результати досліджуваних контролів відповідають очікуваним значенням.

Досліджувані зразки позитивні, якщо значення Ct FAM менше або дорівнює 35 ( $Ct \leq 35$ ), це свідчить про ампліфікацію гена, що кодує специфічну ділянку вірусу хвороби Тешена. Зразок вважається негативним, якщо значення Ct FAM відсутнє, але значення Ct JOE менше або дорівнює 35 ( $Ct \leq 35$ ).

Для оцінки придатності даної методики застосовували декілька параметрів, що необхідні при валідації методики з якісного аналізу, а саме: чутливість методу (Limit of detection – LOD), збіжність результатів, специфічність і достовірність.

**Результати визначення чутливості методу (LOD).** Для визначення чутливості методу нами було використано діагностичний штам вірусу хвороби Тешена «Березнянський – 652», який зберігається в колекції штамів лабораторії ентеровірусних хвороб свиней IBM НААН.

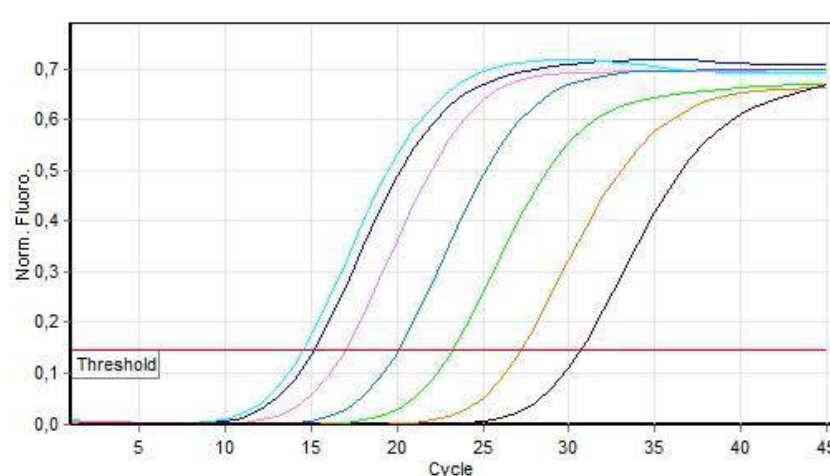
У даному зразку було визначено кількість вірусних геном-еквівалентів (ГЕ/см<sup>3</sup>), що становило  $1,4 \times 10^9$  ГЕ/см<sup>3</sup>. Використовували у 8 концентраціях, для кожної концентрації проводили аналіз не менше 10 незалежних повторів, вимірювання яких проводили на різних рівнях у випадковому порядку. Результати визначення межі виявлення наведені в табл. 5, облік одного з повторів – на рис. 1.

Результати, зазначені у табл. 5 свідчать про те, що довірчий інтервал аналітичної чутливості методу за концентрації  $1,4 \times 10^9$  ГЕ/см<sup>3</sup> –  $1,4 \times 10^4$  ГЕ/см<sup>3</sup> становив 100%. Лише за концентрації  $1,4 \times 10^3$  ГЕ/см<sup>3</sup> довірчий інтервал аналітичної чутливості методу становив 40%, а за концентрації  $1,4 \times 10^2$  ГЕ/см<sup>3</sup> чутливість була відсутньою. Тобто межа виявлення (LOD) досліджуваної методики становить  $1,4 \times 10^4$  ГЕ/см<sup>3</sup>.

Таблиця 5

**Визначення межі виявлення вірусу хвороби Тешена**

Кількість геномних еквівалентів		$1,4 \times 10^9$ ГЕ/см <sup>3</sup>	$1,4 \times 10^8$ ГЕ/см <sup>3</sup>	$1,4 \times 10^7$ ГЕ/см <sup>3</sup>	$1,4 \times 10^6$ ГЕ/см <sup>3</sup>	$1,4 \times 10^5$ ГЕ/см <sup>3</sup>	$1,4 \times 10^4$ ГЕ/см <sup>3</sup>	$1,4 \times 10^3$ ГЕ/см <sup>3</sup>	$1,4 \times 10^2$ ГЕ/см <sup>3</sup>
Значення $C_t$ у 10 повторах	1	12,09	15,51	18,52	21,32	24,61	27,83	29,88	-
	2	12,32	15,34	18,24	21,45	24,48	27,62	-	-
	3	12,18	15,47	18,39	21,18	24,52	27,76	30,12	-
	4	12,25	15,75	18,61	20,95	25,04	28,11	-	-
	5	12,64	15,22	17,97	21,26	24,79	27,58	-	-
	6	12,48	16,1	18,16	21,53	24,37	28,24	29,94	-
	7	13,02	15,19	18,48	21,6	24,26	27,93	-	-
	8	12,75	15,66	18,73	21,33	24,63	28,36	-	-
	9	13,07	16,15	17,88	21,82	25,1	28,47	-	-
	10	12,58	15,83	18,56	21,74	24,17	27,73	30,66	-
Середня $C_t$		12,54	15,62	18,35	21,42	24,60	27,96	30,15	
SD		0,34	0,34	0,28	0,26	0,31	0,32	0,35	
CV		2,71	2,18	1,53	1,21	1,26	1,14	1,16	
Кількість реплікатів		10	10	10	10	10	10	10	10
Позитивні/негативні результати		10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	4/6	0/10
Аналітична чутливість, %		100	100	100	100	100	100	40	0



**Рис. 1. Результати визначення чутливості методу в одному повторі за барвником FAM.**

За отриманими кривими ампліфікації (рис. 1) визначали також лінійність та ефективність ампліфікації для цільової послідовності. Результати оцінювали за допомогою регресійного аналізу залежності значення граничного циклу ( $C_t$ ) від логарифму початкової концентрації геном-еквівалентів кДНК тешовірусу (рис. 2).

Standard Curve

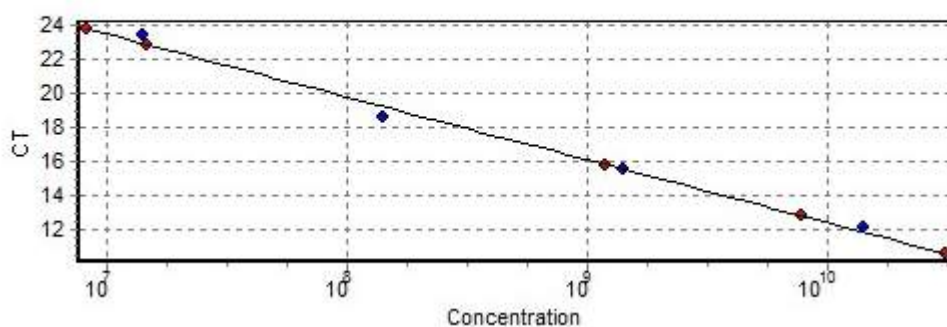


Рис. 2. Калібрувальна крива залежності граничного циклу (Ct) від log початкової кількості копій геном-еквівалентів кДНК тешовірусу.

Ефективність ампліфікації визначали зазначенням кута нахилу (slope) калібрувального графіку (формула 1):

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100 \quad (1)$$

У табл. 6 представлені значення кута нахилу калібрувальних графіків, ефективність ампліфікації та коефіцієнт кореляції лінійної регресії ( $R^2$ ) для цільової послідовності на основі трьох незалежних експериментів.

Таблиця 6

**Результати визначення ефективності та лінійності ампліфікації**

n	Кут нахилу калібрувальної кривої (slope)	Ефективність ПЛР, E (%)	Лінійність, $R^2$
1	-3,27	100,00	0,98
2	-3,48	93,60	0,99
3	-3,62	88,70	0,99
середнє	<b>-3,46</b>	<b>94,10</b>	<b>0,99</b>

Слід відмітити чітку лінійну залежність експериментальних значень Ct від логарифму початкової концентрації геном-еквівалентів кДНК тешовірусу ( $R^2 \geq 0,99$ ). Отримані значення нахилу калібрувальних графіків (від -3,27 до -3,62) свідчать про ефективність ампліфікації не менше 94%, що повністю задовольняє вимоги щодо кількісного аналізу вмісту нуклеїнових кислот у полімеразній ланцюговій реакції в режимі реального часу.

**Аналіз збіжності результатів виявлення РНК вірусу хвороби Тешена.**

Збіжність результатів досліджень – це відсутність статистично значимих розбіжностей між характеристиками тесту при вимірюваннях, які виконуються декілька разів в одних умовах.

Збіжність отриманих результатів досліджень вираховували з визначенням коефіцієнту варіації (CV %), який оцінювали за показниками Ct. Результати оцінки збіжності отриманих результатів викладені в табл. 7.

Таблиця 7

**Оцінка збіжності результатів виявлення РНК вірусу хвороби Тешена 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	14,52	14,63	0,35	2,39	Не більше 0,5	3,48
2	14,35					
3	14,46					
4	14,74					
5	14,23					
6	15,17					
7	14,19					
8	14,66					
9	15,15					
10	14,83					

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 метода не більше 0,5).

Прийнятне значення коефіцієнту варіації розраховували за формулою 2:

$$\%CVv = 100 \times (\%SDv / Ct_{сер}) = 100 \times (0,5 / Ct_{сер}) \quad (2)$$

За даними наведеними у табл. 7, мінімальне значення Ct складало 14,23 та максимальне – 15,17, а середнє – 14,63. Подальші розрахунки показали, що валідоване значення стандартного відхилення (SD) в наших досліджах становило 0,35%, що на 0,15% нижче від максимально допустимого рівня прийнятного значення стандартного відхилення для методу (SD ≤ 0,5). Коефіцієнт варіації (% CV) при постановці досліджуваного становить 2,39%, що також нижче від прийнятного значення коефіцієнту варіації для методу (CVv ≤ 3,48).

В результаті аналізу отриманих результатів встановлено, що % CV ≤ % CVv, що свідчить про збіжність результатів якісного виявлення РНК вірусу хвороби Тешена.

**Визначення специфічності методу.** Специфічність методу визначали шляхом ампліфікації РНК з біологічного матеріалу та гібридизаційно-флуоресцентної детекції продуктів ампліфікації в режимі реального часу.

При визначенні специфічності методу ми використали позитивний та негативний біологічні матеріали щодо вірусу хвороби Тешена, а також три сторонніх збудника вірусних захворювань свиней (хвороби Ауескі, цирковірусної інфекції 2 типу, репродуктивно-респіраторного синдрому свиней), які поєднували у співвідношенні 1:1 з позитивним біологічним



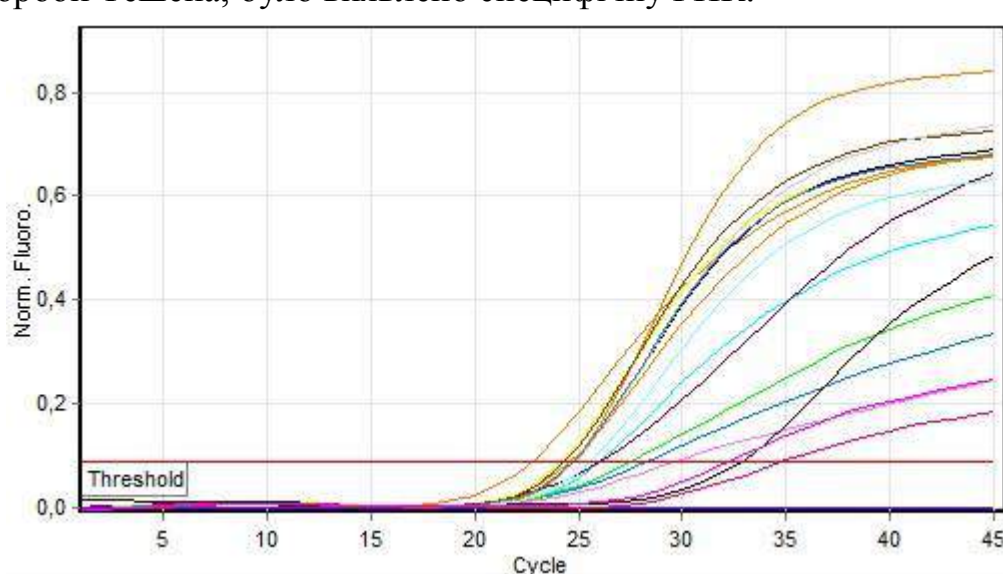
матеріалом (ПБМ) та негативним біологічним матеріалом (НБМ). Результати досліджень зведені в табл. 8 та представлені на рис. 3.

Таблиця 8

**Визначення специфічності методики**

№ з/п	Вид досліджуваного матеріалу	Кількість зразків	Результати виявлення РНК вірусу хвороби Тешена	
			позитивні	негативні
1	Культура клітин СНЕВ, що не містить вірус хвороби Тешена (НБМ)	5	0	5
2	Вірус хвороби Тешена, штам «Березнянський – 652» (ПБМ)	10	10	0
3	Вірус хвороби Ауескі – штам «Петриківський – 2006» + НБМ	3	0	3
4	Вірус хвороби Ауескі, штам «Петриківський – 2006» + ПБМ	3	3	0
5	Цирковірус свиней 2 типу, штам «Stoon 1010» + НБМ	3	0	3
6	Цирковірус свиней 2 типу, штам «Stoon 1010» + ПБМ	3	3	0
7	Вірус РРСС Європейського генотипу, штам «Lelystad» + НБМ	3	0	3
8	Вірус РРСС Європейського генотипу, штам «Lelystad» + ПБМ	3	3	0

Результати табл. 8 свідчать про те, що у зразках біологічного матеріалу, що містили сторонні віруси (хвороби Ауескі, цирковірусу 2 типу, репродуктивно-респіраторного синдрому свиней), не було виявлено РНК вірусу хвороби Тешена. У той же час у зразках біологічного матеріалу, що містив вірус хвороби Тешена, було виявлено специфічну РНК.



**Рис. 3. Результати ампліфікації кДНК вірусу хвороби Тешена у досліджуваних зразках щодо визначення специфічності методики.**

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

**Достовірність методики.** З метою оцінки достовірності даної методики нами проведено міжлабораторне порівняння з Українською лабораторією якості та безпеки продукції АПК (УЛЯБП АПК). При цьому використовували позитивні та негативні зразки біологічного матеріалу щодо вірусу хвороби Тешена. Результати міжлабораторного порівняння наведені в таблиці 9.

Таблиця 9

**Результати міжлабораторного порівняння виявлення РНК вірусу хвороби Тешена методом ПЛР у реальному часі**

Зразок	ІВМ НААН	УЛЯБП АПК	Відповідність
1	негативний	негативний	співпадає
2	позитивний	позитивний	співпадає
3	негативний	негативний	співпадає
4	позитивний	позитивний	співпадає
5	негативний	негативний	співпадає
6	позитивний	позитивний	співпадає
7	негативний	негативний	співпадає
8	позитивний	позитивний	співпадає

У зазначених лабораторіях виявлено 100% відповідність отриманих результатів у всіх 8 пробах.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** Проведеними дослідженнями встановлено, що межа виявлення (LOD) валідованої методики становить  $1,4 \times 10^4$  ГЕ/см<sup>3</sup>, ефективність ампліфікації не менше 94%. Отримана висока збіжність результатів, так як коефіцієнт варіації при постановці досліду відповідає 2,39%; що нижче від прийнятного значення коефіцієнту варіації для методу ( $CV \leq 3,48$ ). Специфічність та достовірність методики складає близько 100% для досліджуваних зразків. Встановлена відсутність хибних результатів і неспецифічних реакцій зі штамами гетерологічних вірусів.

В результаті проведених досліджень встановлено, що розроблена та валідована методика виявлення РНК вірусу хвороби Тешена методом ПЛР у реальному часі відповідає міжнародним вимогам і гарантує отримання точних та достовірних результатів. Запропонована методика буде рекомендована для впровадження в лабораторіях ветеринарної медицини з метою діагностики хвороби Тешена, проведення моніторингу та контролю за розповсюдженням даної інфекції.

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Романенко В.П. Хвороба Тешена (ензоотичний енцефаломієліт свиней) / В.П. Романенко / К.: 2001. – 64 с.
2. Керованість інфекційним процесом при ентеровірусних хворобах свиней/ В.П. Романенко, В.Б. Білоштан, Л.М. Музикіна та ін. // Вет. біотехнологія. – 2007. – № 10. – С. 188–195.
3. Романенко В.П. Сучасні методи і засоби діагностики та профілактики хвороби Тешена свиней / В.П. Романенко // Ветеринарна медицина України. – 2013. – № 1. – С. 10–13.

4. Романенко В.П. Ентеровіруси свиней і їх роль у природному середовищі / В.П. Романенко // Вісник аграрної науки. – 2010. – №12. – С. 27–30.
5. Романенко В.П. Поширення ентеровірусів свиней в умовах зони Полісся УРСР / В.П. Романенко, В.Н. Опанасенко // Мікробіологічний журнал. – 1972. – № 1. – С. 121–122.
6. Романенко В.П. Хвороба Тешена / Романенко В.П. // К.: Урожай. – 1974. – С. 80.
7. Романенко В.Ф. Энзоотический энцефаломиелит свиней (болезнь Тешена) / В.Ф. Романенко, Н.С. Катасонов, Ю.И. Петрище, И.В. Швев // Ветеринария. – 1974. – № 2. – С. 61–62.
8. Классификация энтеровирусов свиней / В.Ф. Романенко, О.Г. Прусс, А.А. Бокун и др. // Вісник аграрної науки. – К., 1993. – № 1. – С. 94–101.
9. Enterovirus encephalomyelitis in pigs in Japan caused by porcine teschovirus / M. Yamada, R. Kozakura, R. Ikegami et al // Veterinary Record. – 2004. – № 155 (10). – P. 304–306.
10. Sereika V. Seroprevalence of antibodies against porcine teschovirus 1 in Lithuania / Sereika V., Lelesius R., Zienius D // Archives of Virology. – 2007. – № 152 (5). – P. 929–940.
11. Prodelalova J. Genotyping of porcine teschoviruses isolated from 1960 to 1980 in the former Czechoslovakia and new Porcine teschovirus isolates obtained from piglets with diarrhoea / J. Prodelalova, H. Malenovska, L. Valicek // Veterinarni Medicina. – 2009. – № 54 (10). – P. 451–466.
12. Genotyping of Porcine teschovirus from nervous tissue of pigs with and without polioencephalomyelitis in Indiana / D.S. Bangari, R.M. Pogranichniy, T. Gillespie, G.W. Stevenson // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 2010. – № 22 (4). – P. 594–597.
13. Isolation and characterization of the first Chinese strain of porcine Teschovirus-8 / C.-F. Zhang, S.-J. Cui, S. Hu et al // Journal of Virological Methods. – 2010. – № 167 (2). – P. 208–213.
14. Molecular characterization and phylogenetic analysis of VP1 of porcine enteric picornaviruses isolates in Italy / E. Sozzi, I. Barbieri, A. Lavazza et al // Transboundary and Emerging Diseases. – 2010. – № 57 (6). – P. 434–442.
15. Teschovirus encephalomyelitis (previously enterovirus encephalomyelitis or Teschen/Talfan disease) // OIE Terrestrial Manual 2008, Chapter 2.8.10. – P. 1146–1152 – електронний ресурс – Режим доступу до журн.: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.08.10\\_TESCHOVIRUS\\_ENCEPH.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.10_TESCHOVIRUS_ENCEPH.pdf).
16. Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differetion 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.
17. 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.
18. Molecular and genetic characteristics isolates virus of Porcine enzooticencephalomyelitis isolated from wild boar and domestic swine on the territory of Ukraine / M.P. Sytiuk, V.G. Spurydonov, V.O. Postoienko [et al.] // Біологія тварин. – 2014. – Т. 16, № 4. – С. 133–142.
19. Молекулярно-генетична оцінка поліантигенних ізолятів ентеровірусів свиней / Л.М. Музикіна, В.П. Романенко, Ситюк М.П. та ін. // Вет. біотехнологія. – 2015. – № 27. – С. 210–219.
20. OIE Validation Guidelines – 3.6.3 «Development and optimisation of Nucleadacid detection assays». – 2014. – P. 11.

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК ВИРУСА БОЛЕЗНИ ТЕШЕНА МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ / Музыкина Л.Н., Галка И.В., Сытюк Н.П., Нычик С.А., Ищенко Л. М., Спиридонов В.Г.**

*В статье приведены результаты разработки и валидации методики определения РНК вируса болезни Тешена свиней методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Специфические праймеры разработаны на основе анализа сиквенсов украинских изолятов. Представлены результаты определения чувствительности, сходимости, специфичности и достоверности методики, которые свидетельствуют о возможности ее применения с целью выявления РНК вируса болезни Тешена в биологическом и патологическом материале от домашних и диких свиней.*

**Ключевые слова:** вирус, болезнь Тешена, валидация, ПЦР в режиме реального времени.

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD OF VIRUS TESCHEN DISEASE RNA DETECTION BY REAL TIME PCR / L.M. Muzykina, I.V. Halka, M.P. Sytiuk, S.A. Nychyk, L.M. Ishchenko, V.G. Spirydonov**

**Introduction.** *Enzootic encephalomyelitis (Teschen disease) in pigs is a contagious infectious disease of pigs with signs of CNS lesions, for laboratory diagnostics which are used as classical (RN, RIF) and modern (ELISA, PCR) methods.*

**The goal of the work.** *Develop and conduct a validation of methodology detection of RNA of Teschen disease virus in pathological material by Real-time PCR according to international requirements for use in laboratory diagnostics.*

**Materials and methods.** *The method was based on the identification of virus RNA of Teschen disease in the test sample, application of reverse transcription reaction to produce complementary DNA (cDNA), amplification of cDNA specific plot with using specific oligonucleotide primers along with Taq polymerase enzyme.*

*We registered the result of amplification of cDNA of Teschen disease virus on FAM/Green fluorescence channel and the result of amplification of internal control sample (ICS) – on JOE/Yellow channel. We analyzed results of PCR by the presence or absence of fluorescence curve and threshold line intersection. Validation was conducted by the sensitivity, the convergence of the results, and specificity indices.*

*We used for the sensitivity verification, virus-containing suspension of SNEV cell culture containing  $1.4 \times 10^9$  GE/cm<sup>3</sup> of Teschen disease virus strain «Bereznianskiy – 652». The number of virus genome equivalents per cm<sup>3</sup>. We used 8 concentrations, each one was tested in 10 fold rerun.*

**Results of research and discussion.** *Studies indicated that the confidence interval (CI) of the analytical sensitivity of the method by concentration  $1.4 \times 10^9$ – $1.4 \times 10^4$  GE/cm<sup>3</sup> was 100%. Only in  $1.4 \times 10^3$  GE/cm<sup>3</sup> concentration CI of method sensitivity was 40%, and in  $1.4 \times 10^2$  GE/cm<sup>3</sup> concentration – it was not sensitive at all. Limit of detection of tested test kit was  $1.4 \times 10^4$  GE/cm<sup>3</sup>.*

**Conclusions and prospects for further research.** *Obtained results of determining of method sensitivity, specificity and affinity indicated the possibility of its use for the detection of Teschen disease RNA virus in biological material from domestic and wild pigs.*

**Keywords:** virus, Teschen disease, validation, real time PCR.

#### REFERENCES

1. Romanenko, V.P. (2001). Hvoroba Teshena (enzootychnyj encefalomijelit svynej) [Teschen disease (porcine enzootic encephalomyelitis)]. Kyiv [in Ukrainian].
2. Romanenko, V.P., Biloshtan, V.B., Muzykina, L.M. [et al.] (2007). Kerovanist' infekciynym procesom pry enterovirusnyh hvorobah svynej [Controllability of infectious process of enteroviral disease in pigs]. *Veterynarna Biotekhnologija – Veterinary biotechnology*, 10, 188–195 [in Ukrainian].

3. Romanenko, V.P. (2013). Suchasni metody i zasoby diagnostyky ta profilaktyky hovoroby Teshena svynej [Modern methods and means of diagnosis and prevention of Teschen disease in pigs]. *Veterynarna medycyna Ukrainy – Veterinary medicine of Ukraine*, 1, 10–13 [in Ukrainian].
4. Romanenko, V.P. (2010). Enterovirusy svynej i i'h rol' u pryrodnomu seredovyshhi [Enteroviruses of pigs and their role in the environment]. *Visnyk agrarnoi' nauky – Journal of Agricultural Science*, 12, 27-30.
5. Romanenko, V.P., & Opanasenko, V.N. (1972). Poshyrennja enterovirusiv svynej v umovah zony Polissja URSR [The spread of swine enteroviruses in terms of area of Polissja of Ukrainian SSR]. *Mikrobiologichnyj zhurnal*, 1, 121–122 [in Ukrainian].
6. Romanenko, V.P. (1974). Hvoroba Teshena [Teschen disease]. Kyiv: Urozhaj [in Ukrainian].
7. Romanenko, V.F., Katasonov, N.S., Petrishhe, Ju.I., & Shveb, I.V. (1974). Jenzooticheskij jencefalomielit svinej (bolezni' Teshena) [Enzootic encephalomyelitis of pigs (Teschen disease)]. *Veterinarija – Veterinary science*, 2, 61–62 [in Russian].
8. Romanenko, V.F., Pruss, O.G., Bokun, A.A. et al. (1993). Klassifikacija jenterovirusov svinej [Classification of porcine enterovirus]. *Visnik agrarnoi' nauki - Journal of Agricultural Science*, 1, 94–101 [in Russian].
9. Yamada, M., Kozakura, R., Ikegami, R. et al. (2004). Enterovirus encephalomyelitis in pigs in Japan caused by porcine teschovirus. *Veterinary Record*, 155 (10), 304–306.
10. Sereika, V., Lelesius, R., Zienius, D. (2007). Seroprevalence of antibodies against porcine teschovirus 1 in Lithuania. *Archives of Virology*, 152 (5), 929–940.
11. Prodelalova, J., Malenovska, H., Valicek, L. (2009). Genotyping of porcine teschoviruses isolated from 1960 to 1980 in the former Czechoslovakia and new Porcine teschovirus isolates obtained from piglets with diarrhoea. *Veterinarni Medicina*, 54 (10), 451–466.
12. Bangari, D.S., Pogranichnij, R.M., Gillespie, T., & Stevenson, G.W. (2010). Genotyping of Porcine teschovirus from nervous tissue of pigs with and without polioencephalomyelitis in Indiana. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 4, 594–597.
13. Zhang, C.-F., Cui, S.-J., Hu, S. et al. (2010). Isolation and characterization of the first Chinese strain of porcine Teschovirus-8. *Journal of Virological Methods*, 167 (2), 208–213.
14. Sozzi, E., Barbieri, I., Lavazza, A. et al. (2010). Molecular characterization and phylogenetic analysis of VP1 of porcine enteric picornaviruses isolates in Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57 (6), 434–442.
15. Teschovirus encephalomyelitis (previously enterovirus encephalomyelitis or Teschen / Talfan disease) (2008). *OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.8.10.*, 1146–1152 – [www.oie.int](http://www.oie.int). Retrieved from [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.08.10\\_TESCHOVIRUS\\_ENCEPH.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.10_TESCHOVIRUS_ENCEPH.pdf).
16. Zell, R., Krumbholz, A., Henke, A. et al. (2000). Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differetion of CPE groups I-III specific primer sets. *J. Virol. Methods*, 88, 2, 205–218.
17. Stegnij, B.T., Gerilovich, A.P., Limans'ka, O.Ju. et al. (2010). Polimerazna lancjugova reakcija u praktici veterinarnoi' medicini ta biologichnih doslidzhennjah [Polymerase chain reaction in the practice of veterinary medicine and biological research]. *Naukovo-metodichnij posibnik, Harkiv* [in Ukrainian].
18. Sytiuk, M.P., Spyrndonov, V.G., Postoienko, V.O. et al. (2014). Molecular and genetic characteristics isolates virus of Porcine enzooticencephalomyelitis isolated from wild boar and domestic swine on the territory of Ukraine. *Biologija tvarin – Animal biology*, 16, 4, 133–142.
19. Muzykina, L.M., Romanenko, V.P., Sytiuk, M.P. et al. (2015). Molekuljarno-genetichna ocinka poliantigennih izoljativ enterovirusiv svinej [Molecular and genetic evaluation of poliantyhennyh isolates of porcine enteroviruses]. *Veterynarna Biotehnologija – Veterinary biotechnology*, 27, 210–219 [in Ukraine].
20. «Development and optimisation of Nucleadacid detection assays» (2014). *OIE Validation Guidelines – 3.6.3.*