

## Список літератури

1. Високопатогенний грип птиці [Текст] / Б.Т.Стегній [та ін.]: Под ред. Докт. вет. наук., проф., член-кор. УААН Стегнія Б.Т. – Х.: ННЦ "ІЕКВМ". – 2006. – 144 с. 2. OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Електр. ресурс] / Спосіб доступу: <http://www.oie.int>. – Заголовок з екрану. 3. Розробка вітчизняних засобів специфічної профілактики та діагностики високопатогенного грипу птиці в Україні [Текст] / Г.Б. Іванов [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – №11. – 2007. – С. 27-31.

**ANTIGENIC AND IMMUNOGENIC PROPERTIES OF INACTIVATED VACCINE AGAINST HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA «AVIFLUVAK-IECVM» IN LABORATORY AND WORKING CONDITIONS****Bisyuk I.Yu.**

State Committee of Veterinary Medicine of Ukraine, Kyiv

**Stegniy B.T., Muzyka D.V.**

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

Results of study of antigenic and immunogenic properties of inactivated vaccine against highly pathogenic avian influenza "AviFluVak-IECVM" at carrying out of laboratory and working tests are presented in the article. The level of antibodies in poultry of different species (chickens, ducks, geese, turkeys) after double-ply vaccination and results of control infection of poultry by highly pathogenic virus are given. There was determined, that using of vaccine "AviFluVak-IECVM" for specific prophylaxis of highly pathogenic avian influenza in working conditions provide in poultry the formation of stable tense immunity which able to protect birds from disease.

УДК 619:616.579.887.111

**РОЗРОБКА ДУПЛЕКСНОЇ ПЛР ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ КОНТАМІНАЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ МІКОПЛАЗМАМИ ТА ЗБУДНИКОМ ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ ВРХ****Болотін В.І.<sup>1</sup>**

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Технології виробництва імунологічних препаратів потребують постійного вдосконалення. Зокрема, важливе значення мають засоби контролю сировини тваринного походження, а також готової продукції щодо стерильності та виключення контамінації мікоплазмами і сторонніми вірусами. Це також стосується перещеплюваних культур клітин, що використовуються у наукових дослідженнях та біотехнологічних цілях, які можуть бути джерелом ризиків отримання недостовірних результатів, оскільки сторонні агенти впливають майже на всі показники та параметри клітин *in vitro*. Оцінку цих об'єктів наглядно щодо контамінації проводять із загальноприйнятими вимогами, викладеними у чинних нормативних документах України (ГОСТ 28085-89, ДСТУ 4483:2005, ДСТУ 4613:2006).

Сироватка крові ВРХ, яка в якості поживної субстанції застосовується при виготовленні імунобіологічних препаратів, вакцин, препаратів для контролювання вторинних інфекцій та діагностиків, може бути контамінована мікоплазмами внаслідок недотримання правил відбору, транспортування, фільтрації та зберігання крові. Джерелом розповсюдження мікоплазм може бути також персонал за недотримання вимог та правил належної практики вірусологічної роботи. Вірусна контамінація біопрепаратів та поживних субстанцій, зумовлена здебільшого збудником вірусної діареї ВРХ, є проблемою номер один у сучасній біопромисловості. За результатами багатьох досліджень до 75 % серій сироваток крові ВРХ та до 15 % клітинних ліній можуть бути контаміновані збудником ВД ВРХ [1].

Полімеразна ланцюгова реакція є високочутливим та високоспецифічним методом, здатним виявляти генетичний матеріал інфекційного агенту навіть за незначних концентрацій, коли традиційним методам не вистачає чутливості. Для прискорення отримання результатів використовують мультиплексну ПЛР, суть якої полягає в одночасному визначенні декількох інфекційних агентів в одному зразку [2].

Метою даної роботи було розробити дуплексну ПЛР та оптимізувати протокол ампліфікації для одночасного виявлення генетичного матеріалу мікоплазм та вірусу діареї ВРХ.

**Матеріали і методи.** З метою запобігання виникнення димерів та неспецифічних ампліконів проводили теоретичні дослідження обраних систем праймерів щодо сумісності їх одночасного використання. Для цього застосовували комп'ютерні програми ArliFX 1.1 та AutoDimer 1.0 [3], а також дані, що були отримані у режимі on-line з баз даних EMBL та GenBank.

Виділення нуклеїнових кислот проводили за допомогою методу сорбції [4]. Після проведення зворотної транскрипції, здійснювали реакцію ампліфікації за допомогою систем праймерів BVDV\_F/R для виявлення вірусу діареї ВРХ [5] та F\_1/2 [6] – для мікоплазм. Як позитивний контроль використовували зразки розплідки вірусу діареї ВРХ штаму Oregon, а також 500 нг ДНК референтних штамів *M. orale* N-1, *M. hyorhinis* BTS-7 та *M. bovis* PG45T.

З метою отримання чіткої візуалізації ампліконів та уникнення утворення неспецифічних продуктів реакції проводили оптимізацію протоколу ПЛР за показниками температури відпалу, концентрації праймерів та іонів магнію, кількості ампліфікаційних циклів.

Облік результатів реакції проводили за допомогою УФ-світла після проведення електрофорезу в 1 % агарозному гелі за сили току 30 mA та напруженості 15 В/см.

За допомогою розробленої методики перевіряли сировину для виготовлення імунобіологічних препаратів та зразки культури клітин FLK щодо контамінації вірусом діареї ВРХ та мікоплазмами.

**Результати досліджень.** Для розробки дуплексної ПЛР на першому етапі було обрано системи праймерів для детекції збудника ВД ВРХ та збудників класу *Mollicutes* за двома показниками: відхилення температур відпалу праймерів повинно складати  $\pm 2$  °C. Для отримання чітких результатів необхідно, щоб обрані праймери обмежували ділянки генів розмірами, що відрізняються між собою в межах 100-300 п.н., адже час елонгації буде однаковий. З метою уникнення утворення шпильок та

<sup>1</sup> Науковий керівник – док. вет. наук, проф., акад. НААН України Б.Т.Стегній

## Розділ 2. Ветеринарна вірусологія

димерів праймери перевіряли на сумісність за допомогою біоінформатичного методу.

На наступному етапі експериментально було встановлено, що при застосуванні праймерів BVDV\_F/R розробки ННЦ «ІЕКВМ» та F\_1/2 одночасно в реакції ампліфікації з позитивними контролями утворювалися амплікони відповідної довжини: для збудника ВД ВРХ – 287 п.н. та для мікоплазм – від 450 до 483 п.н. (рис. 1). Реакцію ампліфікації проводили за такою програмою: 1 цикл : 95 °С – 3 хв.; 40 циклів: 95 °С – 20 сек, 55 °С – 20 сек, 72 °С – 40 сек; 1 цикл: 72 °С – 5 хв. Оптимальні концентрації праймерів та іонів магнію склали 10 пМ та 1,5 мМ відповідно, що було доведено у декількох повторях.

За допомогою створеної методики нами було досліджено 47 зразків сироватки крові ВРХ та 9 культур клітин FLK. За проведеними дослідженнями встановлено, що 12 зразків сироватки крові до фільтраційної обробки були контаміновані мікоплазмами, чотири з яких разом з тим містили й генетичний матеріал вірусу діареї ВРХ. Після проведення деконтамінації сироватки, що містили мікоплазми, були повторно досліджені, а отримані результати показали відсутність контамінантів.

Розроблена методика запропонована у якості додаткового тесту при контролюванні сировини біотехнологічного призначення щодо контамінації сторонніми вірусами та мікоплазмами, що значно заощаджує час та матеріали.

### Висновки.

1. Показано ефективність одночасного використання двох систем специфічних праймерів для індикації ДНК представників класу *Mollicutes* та генетичного матеріалу збудника вірусної діареї ВРХ, що обмежують ділянки довжиною 450-480 та 287 п.н. відповідно.

2. За допомогою розробленої методики проведено дослідження зразків сироватки крові ВРХ та культур клітин FLK з метою виявлення контамінації сировини мікоплазмами та вірусом діареї ВРХ. Виявлено генетичний матеріал мікоплазм у 12 зразках сироватки крові ВРХ з 47 досліджених. Вірус діареї ВРХ виявили в чотирьох пробах.

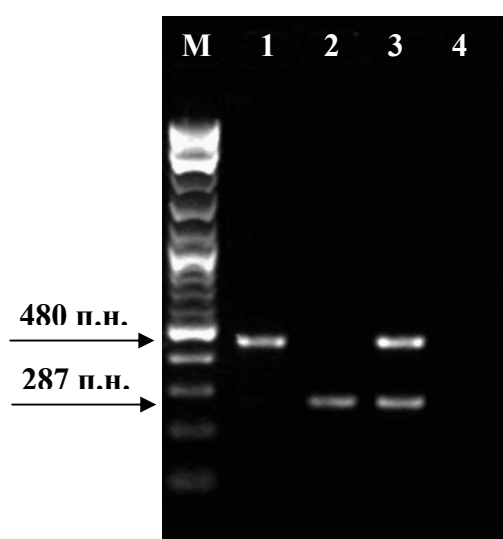


Рис 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами F\_1/2 (трек 1), BVDV\_F/R (трек 2), а також F\_1/2 та BVDV\_F/R (трек 3); М – маркер молекулярної маси 100бр; 4 – негативний контроль.

### Список літератури

1. Levings, R.L. Bovine viral diarrhea contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines [Text] / R.L. Levings, S.J. Wessman // Dev Biol Stand.-1991.-№ 75; P. 177-181.
2. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини: Науково-методичний посібник [Текст] / Б.Т.Стегній, А.П.Герілович, О.Ю. Лиманська, В.І.Болотін, А.В.Скрипник, С.А.Сапко, Р.Ю.Анічин.- Х.: ННЦ «ІЕКВМ», 2006. – 110 с.
3. Vallone, P. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures [Text] / P.Vallone, J. Butler // Biotechniques. – 2004, – №37(2); P. 226-231
4. Boom, R. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids. [Text] / R. Boom, C. Sol, M. Salimans et al.//Journal of Clinical Microbiology.– 1990.–№ 28(3).–P. 495-503
5. Герілович, А.П. Застосування методу полімеразної ланцюгової реакції в системі контролювання контамінації сторонніми вірусами і мікоплазмами ветеринарних імунобіологічних препаратів [Текст] / А.П Герілович. // Бюл. «Біотехнологія». – 2008. – № 13(2). – С. 333-340.
6. Harasawa, R. Detection and identification of dominant mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions [Text] / R. Harasawa, H. Mizusawa, K. Nozawa et al. // Int. Organ. Mycoplasmol. Lett. – 1994. – № 3; P. 68-69.

### DEVELOPMENT OF DUPLEX PCR FOR THE RETECTION OF BIOLOGICAL MATERIALS CONTAMINATION BY MYCOPLASMAS AND BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS

**Bolotin V.I.**

*National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv*

*The biological materials studying procedure that bases on duplex PCR was developed for the detection of contamination by mycoplasmas and BVD virus. With the simultaneous use of two pairs primers 47 samples of blood serum of cattle were examined. As a result, 12 samples contained genetic material of mycoplasma, 4 of which were also contained RNA of BVD virus. The developed procedure was proposed as an additional rapid test for the control of raw animal materials.*