

алюмінію і фосфат алюмінію, які протягом багатьох років використовувалися для підвищення реакції антитіл, наприклад, на токсод дифтерії. Тому проблема розширення арсеналу таких лікарських засобів є актуальною.

Висновки.

1. Вакцинація телят проти колібактеріозу з одночасним введенням комплексного препарату «Антоксан» стимулює формування клітинного компаркменту імунної системи та антиоксидантний захист, що супроводжується збільшенням кількості Т-хелперів ($p < 0,05$), авідності В-лімфоцитів ($p < 0,05$), IgG₂ і IgM ($p < 0,05-0,001$), підвищенням титру специфічних антитіл ($p < 0,05$), бактерицидної та лізоцимної активності ($p < 0,05-0,01$), зменшенням концентрації малонового діальдегіду ($p < 0,05$) та підвищенням активності глутатіонпероксидази ($p < 0,05$) в крові.

2. Комплексний ліпосомальний препарат «Ліпоген» введений поросят за день до відлучення знижує у них стресову реакцію і зменшує пероксидне окиснення ліпідів і підвищує показники клітинних і гуморальних факторів захисту організму. При цьому зростає проліферація, диференціація і дозрівання Т- і В-лімфоцитів та їх функціональна активність ($p < 0,05-0,01$), збільшується бактерицидна і лізоцимна активність сироватки крові ($p < 0,05-0,01$) та фагоцитоз нейтрофілів крові ($p < 0,05-0,01$), знижується концентрація гідроперексидів ліпідів ($p < 0,05$) і збільшується середньодобовий приріст їх маси тіла на 12-15 %.

Список літератури

1. Віщур, О. І. Вплив тимогену і левамізолу на формування клітинного імунітету поросят при вакцинації // О. І. Віщур / Наук.-техн. бюл. Інституту біології тварин УААН і ДНДКІ ветпреп. та корм. добавок. – Львів, 2005. – Вип. 6, № 1. – С. 12-15.
2. Ярема, Н. О. Вплив тималіну на клітинний і гуморальний імунітет у поросят // Н. О. Ярема, В. В. Снітинський, О. І. Віщур / Науково-технічний бюлетень Інституту землеробства і біології тварин. – Львів, 1999. – Вип. 1(3). – С. 198-201.
3. Віщур, О. І. Вплив тимогену і левамізолу на імунобіологічну реактивність у телят // О. І. Віщур, І. В. Кичун, І. В. Скорохід / Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин. – Львів, 2001. – Вип. 1-2. – С. 281-286.
4. Віщур, О. І. Вплив тимогену і левамізолу на формування імунобіологічної реактивності та вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у крові телят при вакцинації // О. І. Віщур, І. Є. Соловдзіньська, Т. О. Сокирко / Наук.-техн. бюл. Ін-ту біол. тварин та ДНДКІ вет. преп. та корм. доб. – Львів, 2007. – Вип. 8. – № 3-4. – С. 37-40.
5. Нові ефективні препарати для профілактики і лікування захворювань у тварин / В. В. Влізло, О. І. Віщур, І. В. Кичун, Р. С. Ясницький // Вет. мед.: Міжвід. темат. наук. збірн. Інституту експерим. і клін. вет. мед. УААН. – Харків, 2004. – № 9. – С. 169-173.
6. Vishchur, O. Application of brand-new preparations for correction of animal's immune functions // O. Vishchur, I. Kychun, N. Salyha / Біологія тварин. – 2002. – Т. 4, № 1-2. – С. 145-148.
7. Технічні умови. №244.30995014.001-2003. Імуномодулюючий препарат «Антоксан» / В. Г. Квачов, Т. О. Сокирко, О. Я. Карась, В. В. Влізло, О. І. Віщур, І. Б. Ратич, Ю. М. Косенко, П. П. Фукс – від 15.04.03. – 16 с.
8. Деклараційний патент на винахід. №67102. Препарат для підвищення імунного потенціалу і антиоксидантного захисту у сільськогосподарських тварин «Антоксан» / О. І. Віщур, В. Г. Квачов – опубл. 15.06.04. Бюл. №6-5 с.
9. Віщур, О. І. Ефективність дії ліпогену на систему антиоксидантного захисту та клітинний імунітет у телят // О. І. Віщур, В. В. Влізло / Вісник аграрної науки. – 2006. – № 11. – С. 44-48.
10. Технічні умови. № 24.4.30995014.002-2003. Препарат протизапальної дії для лікування тварин «Ліпоген» / В. В. Влізло, І. В. Кичун, О. І. Віщур, П. Є. Андрійчук, Р. С. Ясницький. – від 17.07.03. – 30 с.
11. Roy, M. Supplementation with selenium and human immune cells functions. 1. Effect of lymphocyte proliferation and interleukin 2 receptor expression // M. Roy, L. Kiremidjian-Schumacher, H. Wishe / Biol. Trace Elem. Res. – 1994. – 41. – 103-113.
12. Иммунный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений // В. Г. Передерий, А. М. Земсков, Н. Г. Бычков и др. / К. – 1995. – 210 с.
13. Земсков, В. М. Принципы дифференцированной иммунокоррекции // В. М. Земсков, А. М. Земсков / Иммунология. – 1996. – № 3. – С. 4-6.
14. Beel, J. I. Molecular anatomy of immune response // J. I. Beel / Immunol. Rev. – 1998. – V.163. – P. 5-18.

NOVEL CLASS OF IMMUNOTROPIC AND ADJUVANT DRUG COMPOSITIONS FOR PREVENTION of ANIMAL DISEASES

Vlizlo V.V, Vishchur O. I.

Institute of Animal Biology NAAS, Lviv

The new type of immunotropic and adjuvant veterinary drugs ("Antoxan" and "Lipogen") has been created in the Institute of Animal Biology NAAS for treatment and prevention diseases of farm animals. The mechanism of their action implemented via stabilized immunocorrecting glycoproteins, accumulating and emulsifying components and other biologically active substances to ensure their prolonged circulation in blood. Using of this drugs leads to normalizing local and general oxidant status of animals, creates positive effects on the metabolism of fatty acids and fatty acid composition of lipid membrane component of immunocompetent cells, increases the formation of postvaccinal stress, supports optimal metabolic conditions for the reception of antigens, the transition cloned antigen proliferation, regulation and specification of lymphoid cells. High efficiency of the drugs "Antoxan" and "Lipogen" estimated by laboratory tests and implementation in the veterinary practice. The researches of adjuvants and immunogenic properties of nanosized synthetic polymer compounds with potentially using in creation of vaccines for animals were started.

УДК 619:616.34-022-07:636.2-053.2

РОЗРОБКА ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ САЛЬМОНЕЛ У БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ

Герілович А.П., Арєф'єв В.Л., Воек С.І.

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

Сальмонельози є загальносвітовою медико-ветеринарною проблемою. Основні ризики щодо інфікування людей тісно пов'язані з контамінованими сальмонелами продуктами харчування. Це зумовлює необхідність досліджень зі створення засобів ефективної детекції збудника у сировині тваринного походження. У роботі за допомогою методологій біоінформатичного аналізу описана розробка родо- і видоспецифічних олігонуклеотидних систем для детекції мікроорганізмів з групи сальмонел. Створено та перевірено за допомогою засобів мікро- і макроаналізу праймери для індикації ДНК бактерій роду *Salmonella* та серотипів *Salmonella enterica enteritidis* та *typhimurium*. Їх у подальшому планується застосувати для конструювання засобів детекції збудника в харчових продуктах та тваринницькій сировині.

Сальмонельози – це група інфекцій людини, сільськогосподарських та диких тварин і птиці, які етіологічно зумовлюються бактеріями роду *Salmonella* і супроводжуються розладами травної системи різного ступеня, гарячкою та інтоксикацією, що нерідко стають фатальним фактором у патогенезі хвороби [1].

За даними FAO понад 20 % птахівничої продукції у світі контаміновані сальмонелами. Крім того, збудник часто виявляється у молочних і м'ясних продуктах скотарства і вівчарства [2].

Основну роль у структурі контамінантів сільськогосподарської продукції відіграють серотипи *Salmonella enterica enteritidis* та *typhimurium*, що є патогенними для людини і багатьох видів тварин [2, 3].

У сучасному світі система контролю контамінації продуктів харчування сальмонелами та діагностики сальмонельозів тварин і людини ґрунтується на комплексі методів, вирішальними серед яких є виділення збудника та його ідентифікація з використанням мікробіологічних підходів. Все більшої ваги поряд із цим набувають засоби експрес-детекції сальмонел та продуктів їх життєдіяльності у харчах, тваринницькій сировині, які базуються на детекції збудника методами ПЛР та імунологічних кольорових реакцій [1, 4].

Попри наявну ефективність згаданих засобів ветеринарно-санітарної оцінки вони майже повністю відсутні на українському ринку, що стримує розвиток систем оцінки якості та безпечності сільськогосподарської продукції.

У зв'язку з цим, метою наших досліджень була розробка вітчизняних засобів детекції сальмонел у продуктах тваринного походження, першим етапом якої стало конструювання та теоретична перевірка олігонуклеотидів для родо- і серотипоспецифічних тестувань.

Матеріали і методи досліджень. Робота виконана з використанням біостатистичних методів досліджень. З метою розробки олігонуклеотидів були створені локальні бази нуклеотидних послідовностей основних генів та повних геномів сальмонел різних видів, отримані з GenBank.

Аналіз їх щодо консервативності був проведений за допомогою програми BioEdit (v.7.2.4), після чого в областях консервативних мотивів з використанням AmpliX 1.5 були розраховані олігонуклеотиди за принципами видової та міжвидової стабільності послідовностей та питомої специфічності до певних таксонів.

Видо- та родоспецифічні праймери перевіряли методами локального та глобального порівняння за розробленим у ННЦ «ІЕКВМ» алгоритмом [5].

Результати досліджень. На першому етапі наших досліджень були проаналізовані геномні карти сальмонел різних видів та серотипів. Оскільки цільовими для серотипоспецифічної детекції для нас були *S. enterica typhimurium* та *enteritidis*, ми урахували консервативність послідовностей за цими кластерами збудника.

Аналіз баз даних нуклеотидних послідовностей показав, що найбільшою гомогенністю та широтою вибірки секвенованих ділянок характеризувалися гени *InvA* та 16S rRNA, які містили консервативні фрагменти для всіх бактерій роду *Salmonella*. Зважаючи на те, що ген 16S rRNA є традиційним при детекції збудників бактеріозів, а для виявлення сальмонел існує чимало протоколів заснованих на ампліфікації ділянок саме цього гена, ми зупинили свою увагу на більш детальному аналізі гена *InvA*. Рівень його консервативності для сальмонел різних видів становив 95-98 %, та понад 70 % у межах роду. Аналіз цього гена за допомогою програми BioEdit (v.7.2.4) показав наявність шести консервативних ділянок розміром понад 25 п.н., що були придатними для розрахунку загальнородових праймерів. Пошук олігонуклеотидних послідовностей для детекції мікроорганізмів роду *Salmonella* виявив 22 потенційні пари, що відповідали генетично стабільним локусам геномної ДНК сальмонел. При поглибленому аналізі цих послідовностей методами мікроаналізу відібрано шість праймерних систем, які фланкували ділянки гена *InvA* сальмонел різних видів довжиною 230-720 п.н. Дослідження цих олігонуклеотидних пар методами мікроаналізу показали 100 %-ову відповідність однієї з них, що обмежувала ділянку аналізованого гена довжиною біля 380 п.н., яка отримала назву Salm3_4, матриці сальмонел більшості відомих видів та підвидів, включаючи весь спектр збудників, патогенних для людини і сільськогосподарських тварин (рис.).

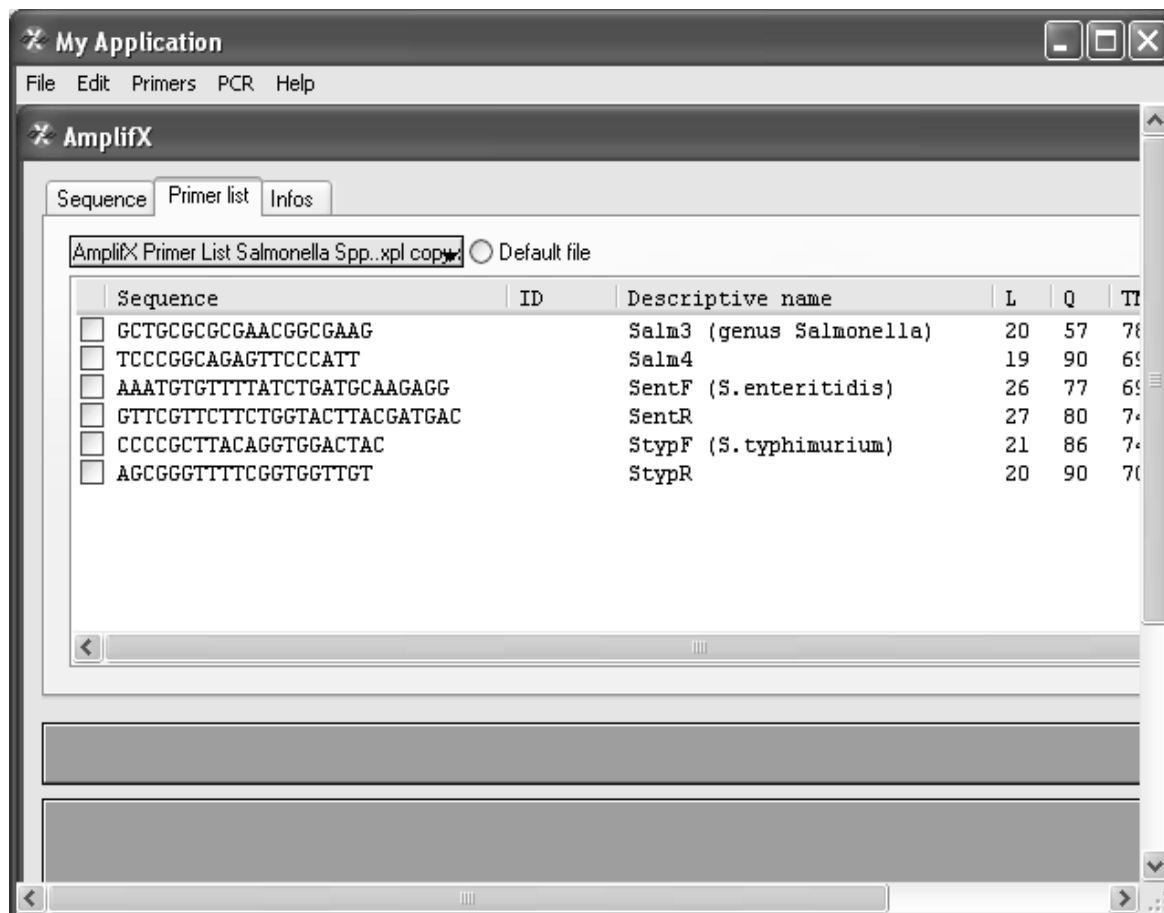


Рис. Діалогове вікно програми AmpliX – праймери для детекції та диференціації бактерій роду *Salmonella*

Геном, що містив серотипоспецифічні мотиви для *S. enterica* сероваріант enteritidis виявився SefA, послідовність якого є високо консервативною для збудників цього типу. Його аналіз дозволив виявити 6 праймерних пар, що мали 97-100 % серотипоспецифічність по відношенню до матриць ДНК збудника. З їх числа за результатами мікро- та макроаналізу були виявлені праймери, що фланкували ділянку довжиною 420 п.н., специфічні до *S. enterica* сероваріант enteritidis. Ці олігонуклеотиди були названі SentF_R.

Для серотиповою детекції *S. enterica* сероваріанту typhimurium специфічним виявився ген fliC. При його поглибленому аналізі нами було встановлено, що він вміщує 8 ділянок, консервативних для досліджуваного кластеру збудників. Розрахунок олігонуклеотидів показав наявність шести праймерних пар, поглиблена оцінка яких дозволила обрати одну, що обмежувала фрагмент цільного гена довжиною 320 п.н. Створені праймери отримали назву StypF_R.

Перевірка якості розроблених олігонуклеотидних пар показала, що вони не містять вироджених та паліндромних ділянок, ознаки формування вторинних структур за низьких енергетичних впливів були відсутні. Різниця температур плавлення для розрахованих праймерів не перевищувала 1 °C. Вони були на 100 % комплементарними до ДНК-матриць сальмонел таргетних груп та мали відповідність у парі не вищу за 65 % та індивідуальну не вищу 85 % стосовно подібних та гетерологічних матриць.

Висновки: 1. За біоінформатичним аналізом фрагментів геному сальмонел різних видів встановлено, що для загально-родової детекції збудника як таргетний може бути використаний ген *InvA*, а для серотипів *Salmonella enterica enteritidis* та *typhimurium* групова специфічність властива послідовностям генів SefA та fliC відповідно.

2. З метою родо- та серотипоспецифічної ампліфікації ДНК сальмонел розроблені праймерні системи Salm3_4, SentF_R та StypF_R, що фланкують ділянки довжинами 380, 420 та 320 п.н. та характеризуються високою передбаченою специфічністю детекції і задовільними показниками ПЛР-quality.

Перспективи подальших досліджень. На основі отриманих результатів зі створення родо- і серотипоспецифічних праймерних систем для виявлення сальмонел в подальшому планується розробка методик з індикації та типування збудника в клінічних зразках та сировині тваринного походження за допомогою ПЛР.

Список літератури

1. Bailey, J. L. Detection of *Salmonella* cells within 24 to 26 hours in poultry samples with the polymerase chain reaction BAX system [text] / J.L. Bailey // J. Food Prot. – 1998 – Vol. 61. – P. 792-795.
2. FAO feedstuff control annual report [text] // FAO newsletter. – 2010. – 282 p.
3. International Organization for Standardization. Microbiology—general guidance on methods for the detection of *Salmonella*. (Revision of 8th ed., ISO: 6579-2008.) International Organization for Standardization, Geneva. – 2008. – 42 p., ann. 4. D'Aoust, J. Y. Pathogenicity of foodborne *Salmonella* [text] / J.Y. D'Aoust. // J. Food Microbiol. – 1991. – Vol. 12. – P. 14-70.
5. Герілович, А. П. Методологія розрахунку та теоретичної перевірки якості олігонуклеотидів для виявлення нуклеїнових кислот патогенів тварин на основі полімеразної ланцюгової реакції [Текст] / А. П. Герілович // Ветеринарна біотехнологія : бюл. / IBM. – К., 2009. – № 14. – С. 56-69.

OLIGONUCLEOTIDE SYSTEME DEVELOPMENT FOR THE DETECTION OF SALMONELLA IN BIOLOGICAL OBJECTS

Gerilovych A.P., Arefyev V.L., Vovk S.I.

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

Salmonellosis is a global medical and veterinary problem. The main risks of human infection are closely linked to food, contaminated with salmonellas. This calls for the studies on establishment of an effective detection of the pathogen in the raw materials of animal origin. This paper represents the data of genus and subtype specific primers development for microbial pathogens from genus Salmonella. Oligonucleotides systems were created and tested by the means of micro- and microanalysis to study indication ability of primers for the detection of DNA of bacteria of genus Salmonella and serotypes of Salmonella enterica enteritidis and typhimurium. They will be used in the design of pathogen detection means for food and raw materials of animal origin examination.

УДК 619:616.98:577.2

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В СИСТЕМІ КОНТРОЛЮВАННЯ ВІРУСНОЇ ТА МІКОПЛАЗМЕННОЇ КОНТАМІНАЦІЇ ОБ'ЄКТІВ ВЕТЕРИНАРНОГО НАГЛЯДУ

Горайчук І.В., Болотін В.І., Герілович А.П., Коровін І.В.

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

Інтенсивний розвиток біотехнології у світі в цілому та нашій державі зокрема призводить до щорічного зростання застосування культур клітин з метою діагностики вірусних та мікоплазменних інфекцій, а також розробки та виготовлення імунобіологічних препаратів. У зв'язку зі збільшенням обсягів освоєння клітинних біотехнологій важливе значення мають засоби контролю сировини тваринного походження, а також готової продукції щодо стерильності та виключення контамінації мікоплазмами та сторонніми вірусами [1, 2].

Контамінація клітинних ліній, а, як наслідок і ветеринарних препаратів може бути зумовлене застосуванням неякісних компонентів поживних середовищ, порушенням правил отримання, накопичення, консервування та зберігання матричних розплодок первинних та перещеплюваних культур, а також виробничих штамів мікроорганізмів [2, 3].

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 поширення 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. Цей збудник може репродукувати без утворення видимих змін у моношарі клітин. Відомо, що антигени контамінантів, зумовлюють неспецифічні реакції штамів вірусів у разі застосування уражених клітин для отримання діагностичних препаратів [1, 4, 5]. За результатами численних досліджень до 75 % серій сироваток крові ВРХ та до 15 % клітинних ліній можуть бути контаміновані збудником ВД ВРХ [6].