

УДК 619:616.682-002-022.6:636.32/38

ДІАГНОСТИЧНІ АСПЕКТИ І НАПРЯМКИ ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ГЕНОМУ *BRUCELLA OVIS* У БІОМАТЕРІАЛІ

Стегній Б.Т., Бабкін А.Ф., Герілович А.П., Болотін В.І., Райко Д.Ю.

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

Симоненко С.І.

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Інфекційний епідидиміт баранів (бруцелаовісна інфекція) реєструється в багатьох країнах світу і завдає значних економічних збитків через порушення селекційної роботи, зниження плідності племінних баранів, недоодержання приплоду, витрат на проведення профілактичних заходів. Збудником хвороби є грамнегативний поліморфний мікроорганізм, рід *Bruceella*, вид *B. ovis*, який відносять до слабівірulentних R-форм бруцел, що еволюційно адаптований до овець та характеризується вираженим тропізмом до придатків статевих залоз баранів-плідників. *B. ovis* має поверхневий гідрофобний R-ліпополісахаридний антиген, який імунологічно споріднений з антигенами інших видів R-форм бруцел [1, 2].

Традиційними методами діагностики хвороби та індикації різних видів збудника бруцельозу є серологічні та бактеріологічні дослідження [3, 4]. Важливим також є ідентифікація генетичних маркерів у штамів бруцел, зокрема з'ясування тенденції молекулярної епідеміології та епізоотології [5, 6]. Новим у діагностиці є розробка і оцінка видоспецифічних праймерних послідовностей для детекції *B. ovis* в зразках сперми, сечі та крові [7].

Метою роботи було проведення досліджень клінічного матеріалу щодо наявності збудника інфекційного епідидиміту баранів з використанням молекулярно-генетичних методів.

Матеріали і методи. У ПЛР досліджено зразки сечі, еякулятів та придатків тестікулів від баранів-плідників, що належали двом господарствам Херсонської області. Як позитивний контроль використовували культуру *B. ovis* з колекції ННЦ «ІЕКВМ». Виготовлена і досліджена експериментальна панель зразків ДНК, екстрагованих з різних концентрацій мікробів *B. ovis*, а також *B. abortus* для визначення специфічності. Сироватки крові від баранів досліджували за допомогою реакції тривалого зв'язування комплементу (РТЗК) [3].

Виділення та культивування бруцел проводили за загальноприйнятими методиками, рекомендованими МЕБ (2009) [4]. Біологічну активність виділених ізолятів визначали шляхом їх висіву на поживні середовища та подальшою ідентифікацією.

Ізоляцію сумарної ДНК *B. ovis* проводили за допомогою комерційного набору для екстракції нуклеїнових кислот «ДНК-сорб-В» виробництва фірми «АмпліСенс» (Російська Федерація). Отримані зразки ДНК досліджували в ПЛР за модифікованою методикою В. Bricker та S. Halling [8] з використанням базових наборів для проведення ампліфікації фірми «АмпліСенс» (Російська Федерація) та системи праймерів AMOS: 5' TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT TGC CAG 3' (прямий) та *B. ovis* – 5' CGG GTT CTG GCA CCA TCG TCG 3' (зворотний), що обмежують ділянку інсерційного елемента довжиною 976 п.н. Оптимізацію ампліфікаційного протоколу проводили шляхом визначення відповідних термічних (температури відпалу, денатурації та елонгації), часових параметрів ампліфікаційних циклів, їх кількістю, а також концентрації компонентів ампліфікаційної суміші (праймерів та іонів магнію).

Електрофоретичний аналіз проводили за допомогою набору для електрофорезу виробництва НВО Нарвак, Російська Федерація. Концентрація агарози в гелі складала 1 %, напруга у електрофоретичній камері відповідала 120 В.

Результати досліджень. Для проведення молекулярно-генетичних досліджень нами було обрано методику В. Bricker та S. Halling, яка є рекомендованою провідними лабораторіями Європейської Унії. Ця методика була адаптована нами з огляду на склад ампліфікаційної суміші та температури відпалу праймерів. Так, автори використовували базовий набір для проведення ампліфікації фірми «Qiagen» (США) з температурою відпалу праймерів 60 °С. У наших дослідженнях ми використовували комерційний набір «ПЛР-суміш-2 blue» фірми «АмпліСенс». З метою уникнення неспецифічних шлейфів та смуг при візуалізації результатів реакції, ми оптимізували склад ПЛР-суміші загального об'єму 25 мкл, який містив 10 мкл «ПЛР-суміші-2 blue», 4 мкл суміші dNTP по 1,76 mM кожного, 2 мкл кожного з двох праймерів IS 711 та *B. ovis* (15 pM), 2 мкл 3,0 mM MgSO₄, 2 мкл деіонізованої води та 5 мкл дослідного зразка ДНК. У серії експериментальних дослідів було встановлено оптимальну температуру відпалу – 55 °С. При цьому відмічали появу чітких контрастних смуг, що відповідали амплікону довжиною 976 п.н.

З метою визначення чутливості та специфічності обраної методики нами було сформовано та досліджено в ПЛР панель зразків ДНК, виділених зі суспензій різних ізолятів та штамів у розведеннях від 10³ до 10⁹ м.к. в 1 мл (табл. 1). Таким чином, панель включала 12 зразків ДНК з *B. ovis* та 4 зразки – з *B. abortus*. За результатами цих досліджень встановлено, що поріг реакції складає 10⁹ м.к./см³. При візуалізації результатів ампліфікації смужка амплікона була більш чіткою для зразка ДНК, екстрагованої зі штаму *B. ovis* 67/«Б», ніж *B. ovis* 76/982. Гібридизація праймерів з ДНК, виділених зі суспензій *B. abortus* 19/770 у концентраціях 10³-10⁹ м.к./см³, не спостерігалася, що свідчило про специфічність обраної методики.

Таблиця 1 – Результати ПЛР-скрінингу сформованої панелі зразків ДНК, отриманих з різних видів бруцел

№№	Вид бруцел, штами	Концентрація, м.к./см ³	Результат
1	<i>B. ovis</i> 67/«Б»	10 ³	-
2		10 ⁵	-
3		10 ⁷	-
4		10 ⁹	+
5	<i>B. ovis</i> 76/982	10 ³	-
6		10 ⁵	-
7		10 ⁷	-
8		10 ⁹	+
9	<i>B. abortus</i> 19/770	10 ³	-
10		10 ⁵	-
11		10 ⁷	-
12		10 ⁹	-
1a	<i>B. ovis</i> 67/«Б»	осад	+
2a	<i>B. ovis</i> 67/«Б» сГБ		+
3a	<i>B. ovis</i> 76/982		+
4a	<i>B. ovis</i> 76/982 сГБ		+
	Позитивний контроль		+
	Негативний контроль		-

Розділ 2. Загальні питання та новітні методи в біотехнології

На наступному етапі досліджували 8 зразків еякулятів та 3 зразки сечі, відібраних від баранів-плідників, сироватки крові яких позитивно реагували з бруцелаовісним антигеном. При дослідженні вказаного матеріалу за допомогою ПЛР ДНК *B. ovis* виявляли в чотирьох зразках еякуляту (рис. 1), проте збудник виділено тільки від одного барана, в інших випадках спостерігався швидкий ріст сторонньої мікрофлори, що пригнічувало культивування бруцел (табл. 2).

Досліджені у ПЛР зразки сечі, відібрані після забою трьох серопозитивних баранів, виявилися негативними, у той час як *B. ovis* виділили від двох тварин. В іншому випадку спостерігали швидкий ріст сторонньої мікрофлори. Такі результати, імовірно, свідчать про низьку концентрацію бруцел в зразках сечі, недостатню для їх виявлення за допомогою ПЛР.

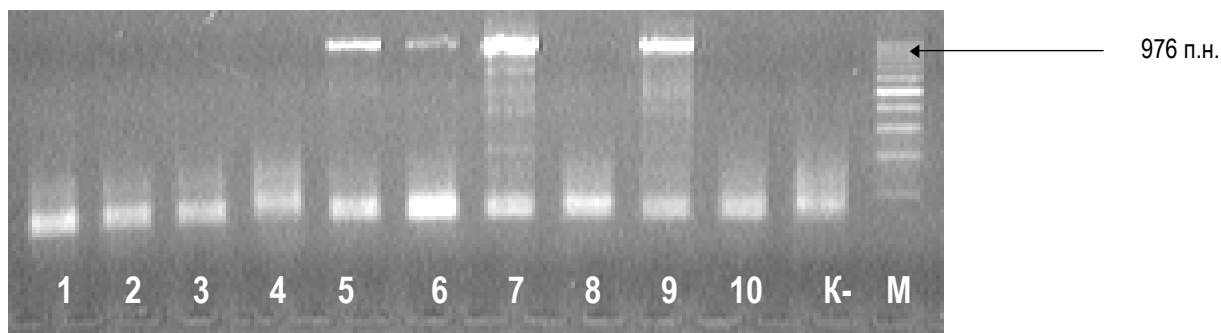


Рис. 1 Електрофореграма результатів ПЛР щодо наявності генетичного матеріалу збудника інфекційного епідидиміту баранів: М – маркер молекулярної маси; К- – негативний контроль; 1 – сироватка крові з антитілами проти *B. ovis* (I); 2 – сироватка крові з антитілами проти *B. ovis* (II); 3 – зразок еякуляту барана-плідника інв. № 28955; 4 – 28995; 5 – 30115; 6 – 00440 (I); 7 – 00440 (II); 8 – 2900; 9 – 00441; 10 – 28143.

Таблиця 2 – Результати серологічних, бактеріологічних та молекулярно-генетичних досліджень клінічного матеріалу від баранів-плідників щодо інфекційного епідидиміту

Інв. №	Сироватка	Еякуляти			Сеча з міхура	
	РТЗК	Біологічна активність	ПЛР	Ізольовано <i>B. ovis</i>	ПЛР	Ізольовано <i>B. ovis</i>
28955	-	3,46±0,53	-	-	н/д	
28995	-	2,03±0,15	-	-		
29000	-	2,57±0,16	-	-		
28143	-	4,7±0,75	-	-		
00440 (I)	+	5,5	+	-*	-	+
00440 (II)	+	5,5	+	+	-	+
30115	+	7,5	+	-*	-	-
00441	+	6,5	+	-*	-	+

Примітка: * - швидкий ріст сторонньої мікрофлори; н/д – не досліджували

Схожі результати були отримані при дослідженні зразків патологічного матеріалу від баранів-плідників, які виявилися вільними від ДНК *B. ovis*. Проте за допомогою бактеріологічних методів досліджень виділили 4 ізоляти бруцел (табл. 3). Такий стан речей може бути пов'язаний з недостатньою кількістю генетичного матеріалу збудника в зразках придатка сім'яника або внаслідок інгібування ферментної складової ампліфікаційної суміші на стадії проведення ПЛР. У той же час за допомогою цієї методики була встановлена аутентичність ізольованих бруцел.

Таблиця 3 – Результати ПЛР та бактеріологічних досліджень біоматеріалу від хворих баранів-плідників після забою

Інв. № тварини	Зразки матеріалу	ПЛР	Ізоляція бруцел
00441	голівка придатку сім'яника 1	-	+
	голівка придатку сім'яника 2	-	+
	тіло придатку сім'яника 1	-	-
	тіло придатку сім'яника 2	-	-
30115	голівка придатку сім'яника 1	-	+
	голівка придатку сім'яника 2	-	-
	тіло придатку сім'яника 1	-	-
	тіло придатку сім'яника 2	-	-
00440	голівка придатку сім'яника 1	-	-
	голівка придатку сім'яника 2	-	-
	тіло придатку сім'яника 1	-	-
	тіло придатку сім'яника 2	-	+
Позитивний контроль (екстракт термокультури <i>B. ovis</i> 175/1257, 13×10^{10} м.к./см ³)		+	
Позитивний контроль (екстракт термокультури <i>B. ovis</i> 156/7808 13×10^{10} м.к./см ³)		+	
Негативний контроль		-	

Висновки.

1. Відпрацьовано та адаптовано методику виявлення генетичного матеріалу *B. ovis* за допомогою ПЛР на панелі зразків ДНК, отриманих з різних ізолятів збудника інфекційного епідидиміту баранів, а також одного штаму *B. abortus*. Встановлено високу видоспецифічність використаної методики по відношенню до *B. ovis*, при чому чутливість тесту у цих дослідах дорівнювала 10^9 м.к./см³.

2. При дослідженні зразків клінічного матеріалу від баранів-плідників за допомогою модифікованої методики ДНК *B. ovis* виявили у зразках еякуляту від серопозитивних тварин. Зразки ДНК, отримані з проб придатку сім'яника баранів-плідників, не містили генетичний матеріал бруцел.

3. Результати проведених досліджень свідчать про перспективність застосування ПЛР у системі діагностики інфекційного епідидиміту баранів, а також при контролюванні баранів-плідників.

Список літератури

1. Бабкин, А.Ф. Серологическая идентификация культур возбудителя инфекционного эпидидимита баранов – *Brucella ovis* / А.Ф. Бабкин, Н.И. Галищев и С.В. Мелихов // Пробл. зооинженерии та вет. медицины: Матеріали 5-го з'їзду паразитологів України (м. Харків, 5-6 квітня 2001 р.): 36. наук. праць / ХЗВІ. – Х., 2001. – С. 68-69. 2. Бабкин, А.Ф. RS-форми бруцелл как индикатор антигенной неоднородности штаммов возбудителя инфекционного эпидидимита баранов *Brucella ovis* / А.Ф. Бабкин и С.В. Мелихов // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2003. – Вип. 82. – С. 63-66. 3. Настанова по діагностиці бруцельозу тварин. – Державний департамент ветеринарної медицини, К., – 1998. – 59 с. 4. Office international epizootical Terrestrial Code [E. source] // 18th Edition, 2009, Спосіб доступу URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.09_OVINE_EPID.pdf – Title from the screen. 5. Kulakov, Y.K. Identification of genetic markers in *Brucella* strains circulating in Russia for use in molecular epidemiology / Y.K. Kulakov, M.M. Zheludkov, O.D. Sklyarov // Mat. Intern. Confer. Brucellosis 2008, UK. – London. – 2008. – P.67. 6. Xavier, M.N. Development and evaluation of a specific PCR test for detection of *Brucella ovis* in semen, urine and blood samples. / M.N. Xavier, T.A. Paixão, A.M.G. Gouveia et al. // Mat. Intern. Confer. Brucellosis 2008, UK. – London. – 2008. – 184 p. 7. Almendra, C. Development and validation of a quantitative PCR test to detect *Brucella* spp in non-invasive fecal and urine samples / C. Almendra, A. Beja-Pereira, A.C. Ferreira // Mat. Intern. Confer. Brucellosis 2008, UK. – London. – 2008. – 187 p. 8. Bricker, B.J. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. / B.J. Bricker, S.M. Halling // J. Clin Microbiol. – 1994. – №32(11) – P.2660-2666.

DIAGNOSTIC ASPECTS AND DIRECTIONS OF POLYMERASE CHAIN REACTION USING FOR THE BRUCELLA OVIS GENOME DETECTION IN BIOMATERIALS

Stegniy B.T., Babkin A.F., Gerilovych A.P., Bolotin V.I., Raiko D.Yu.

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

Symonenko S.I.

Kharkiv State Zooveterinary Academy

This work is dedicated to improving the diagnosis of infectious epididymitis of rams by the use of molecular-genetic methods for studying the clinical material from animals, as well as cultures of Brucella. It was selected and adapted the method of insertion element amplification with the length 976 bp, optimized reaction protocol and selected components of the reaction composition. As the results the DNA B. ovis was detected in samples of semen from seropositive rams, but the samples of the epididymitis testis were free from the B. ovis genetic material.

УДК 57.043:578.71

**ТРИВАЛЕ ЗБЕРІГАННЯ ВІРУСІВ ЗА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР
У БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ**

Стегній М.Ю.

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

На цей час одним з найбільш надійних методів, що забезпечують довгострокове зберігання біологічних об'єктів, є криоконсервування. Його успіх залежить від низки факторів: виду біологічного об'єкту, концентрації біологічного матеріалу в суспензії, режимів криоконсервування, складу середовища консервування, типу й концентрації криопротектора тощо. Одним з найбільш широко використовуваних методів, що забезпечують довгострокове зберігання біологічних об'єктів, є криоконсервування та зберігання їх у рідкому азоті. Застосування криопротекторів дозволяє знизити ушкоджуючу дію фізико-хімічних факторів при криоконсервуванні. Проте, як свідчать численні дані, більшість криопротекторів є токсичними для біологічних об'єктів, що потребує або сконструювати склад середовища з мінімальною токсичністю, або підібрати оптимальні режими охолодження та відтавання без використання криопротекторів з наступним оптимальним режимом тривалого зберігання для довгочасного збереження їх вихідних властивостей.

Збереження вихідної антигенної структури і стабілізація біологічних властивостей вірусів дуже важливі як елемент біотехнології виробництва засобів специфічної профілактики та діагностики грипу птиці, ньюкаслської хвороби птахів, а також актуальних адено- та ротавірусних інфекцій людини з одного боку, та для збереження колекційних штамів цих захворювань – з іншого. Безперервне культивування вірусних штамів у лабораторних умовах являє трудомісткий, економічно не вигідний процес, який нерідко призводить до зміни їхньої антигенної структури й біологічних властивостей. Отже мета досліджень – вивчення збереженості вірусів, підданих криоконсервуванню, та розробка на цій основі оптимальних режимів їхнього довгострокового зберігання є важливим елементом біотехнології виробництва імунобіологічних препаратів.

Матеріали і методи досліджень. У проведених дослідженнях вивчалась збереженість вихідних властивостей вірусу високопатогенного грипу (ВГП) штам «А/курка/Сиваш/02/05(Н5N1)». Для чого вірусмішучу екстраембріональну рідину після проведення 5 пасажів на SPF курячих ембріонах розфасувували в криопробірки ємністю 1,8 мл фірми «Nunc» (Данія) і криоконсервували за температур мінус 20 °С та мінус 70 °С. Іншу частину екстраембріональної рідини в таких же пробірках заморожували шляхом прямого занурення в рідкий азот (мінус 196 °С) зі швидкістю 300-400° за хвилину. Розморозування зразків здійснювали на водяній бані за температури 39 °С протягом 2 хвилин.

Інфекційну активність визначали титруванням вірусу на 9-10 добових курячих ембріонах за стандартною методикою. Розрахунок титру вели за Рідом й Менчем. Стандартне відхилення титру розраховували згідно з формулою Піцці. Гемаглютинуючу активність визначали у РГА з 1 % суспензією еритроцитів півня за загальноприйнятою методикою [4].