

– 2011. – Vol. 193, № 20. – P. 5675-5682. 4. Щелкунов, С.Н. Клонирование генов [Текст] / С.Н. Щелкунов // Наука. – 1986. – С. 228. 5. Yokoyama, N. Recombinant viral vector vaccines for the veterinary use [Text] / N. Yokoyama, K. Maeda, T. Mikami // J. Vet. Med. Sci. – 1997. – Vol. 59, № 5. – P. 311-322. 6. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate [Text] / C.H. Kweon [et al.] // Vaccine. – 1999. – Vol. 17, № 20-21. – P. 2546-2553. 7. Immunocytochemical confirmation of prion protein [Text] / J. Clinton [et al.] // Lancet. – 1990. – Vol. 336, № 8713. – P. 515. 8. Ghazizadeh, S. Repression of retrovirus-mediated transgene expression by interferons: implications for gene therapy [Text] / S. Ghazizadeh, J.M. Carroll, L.B. Taichman // J. Virol. – 1997. – Vol. 71, № 12. – P. 9163-9169. 9. Multiple shRNAs driven by U6 and CMV promoter enhances efficiency of antiviral effects against foot-and-mouth disease virus [Text] / S.M. Kim [et al.] // Antiviral. Res. – 2010. – Vol. 87, № 3. – P. 307-317. 10. High-level expression of Marek's disease virus glycoprotein C is detrimental to virus growth in vitro [Text] / B.K. Tischer [et al.] // J. Virol. – 2005. – Vol. 79, № 10. – P. 5889-5899. 11. The protein encoded by the US3 orthologue of Marek's disease virus is required for efficient de-envelopment of perinuclear virions and involved in actin stress fiber breakdown [Text] / D. Schumacher [et al.] // J. Virol. – 2005. – Vol. 79, № 7. – P. 3987-3997.

DEVELOPMENT OF SPECIES SPECIFIC PROMOTER CASSETTES FOR CLONING VIRUS GENES OF ANIMALS

Gerilovych A.P.

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

The development of modern biotechnologies of means for animal protection provides design, implementation and improvement of methodologies associated with recombinant DNA using. The paper is devoted to the development of species specific promoter cluster vectors suitable for reception of expression vectors in prokaryotic and eukaryotic systems. Work is performed using bioinformatics methods. Primer systems for species specific promoter sites of genes of cattle, pigs and poultry and models of vector DNA were calculated. The received results will be used to obtain a vector constructions.

УДК 619:616. 988: 638.4

БІОІНФОРМАТИВНА РОЗРОБКА ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ ТИПУВАННЯ ЦИРКОВІРУСІВ СВИНЕЙ II ТИПУ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Герілович А.П., Рудова Н.Г.

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

Цирковірусна інфекція свиней поширена у більшості країн світу, де розвинене свинарство. Збудник хвороби, цирковірус свиней II типу (ЦВС-II), має декілька генотипів, визначення яких дозволяє встановити походження вірусу. У статті описані результати досліджень з біоінформатичної оцінки поліморфізму геномів ЦВС-II та розрахунку олігонуклеотидів до генотипів 2.1, 2.2 та нового генотипу 2.3. Проведені теоретичні дослідження щодо широти детекції та внутрішньовидової специфічності розроблених праймерів.

Цирковірусна інфекція свиней (ЦВІС) – це хронічна мультисистемна вірусна хвороба свиней різного віку, що супроводжується розладами імунної системи та перебігає у формі виснаження та імунопатії, клінічні ознаки яких залежать від природи супутніх інфекцій. Збудником ЦВІС є цирковірус свиней типу II (ЦВС-II), який належить до родини *Circoviridae*. Цирковіруси є ДНК-вміщуючими патогенами з одноланцюговим циркулярним геномом, не викликають ЦПД у культурах клітин, що ускладнює лабораторну діагностику ЦВІС [1].

Детекція вірусу стає можливою лише за умов виявлення антигена збудника за допомогою імуногістохімічних та імуноцитохімічних методів, або нуклеїнової кислоти за полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) або гібридизації *in situ* [2].

Певні складнощі у лабораторній діагностиці цирковірусної інфекції зумовлює надзвичайний генетичний поліморфізм вірусної популяції. У доступній літературі описано декілька генетичних субліній вірусу, зокрема штами патогенного для свиней другого серотипу вірусу розподіляють на декілька генотипів: 2.1 (європейський), 2.2 (американський), а віднедавна описаний генотип 2.3 (представлений трьома ізолятами, виділеними в Китайській народній республіці) [3, 4].

У наших ранніх дослідженнях була розроблена система праймерів для серотипоспецифічної детекції ЦВС-II. Згадана розробка була покладена в основу тест-системи для виявлення ДНК цирковірусу типу II "Sui-DNA-test-PCV-2". Вона придатна для виявлення збудника, а одержуваний амплікон може бути секвенований та використаний для генотипування, натомість це потребує значних фінансових витрат та спеціалізованого обладнання, що унеможливує широке використання цієї методології [5].

У зв'язку з цим метою наших досліджень була розробка системи генотипування цирковірусів свиней за ПЛР. Першим кроком у реалізації цієї мети є розрахунок праймерів для мультиплексної індикації ЦВС-II та ідентифікації окремих його генотипів у форматі мультиплексної ПЛР.

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 ЦВС-II генотипів 2.1, 2.2 та 2.3, які були отримані з GenBank-публікацій повних геномів та генів *gcp* і *garp*.

Їх аналіз 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 генотипової стабільності послідовностей та питомої специфічності до певних генетичних ліній цирковірусів.

Видо- та родоспецифічні праймери перевіряли методами локального та глобального порівняння за розробленим у ННЦ «ІЕКВМ» алгоритмом [6].

Результати досліджень. На першому етапі наших досліджень були проведені порівняльні дослідження послідовностей цирковірусу свиней II типу, отримані з бази даних GenBank. ЦВС-II генотипу 2.1 (54 послідовності) вміщували 17 консервативних ділянок, придатних для створення праймерів, 4 з яких не перемижались з консервативними ділянками інших генотипів. У межах зазначених ділянок було обрано 12 імовірних праймерних пар, з яких за показниками генотипової специфічності та якості відібрано дві пари, котрі фланкували ділянки гена *gcp* довжиною 233 та 440 п.н. Зважаючи на малу різницю у довжині теоретичних ампліконів, фланкованих праймерами PCV-2, для синтезу була обрана лише перша пара, яка отримала назву PCV 2-1.

Аналіз консервативних фрагментів 14 послідовностей окремих генів та повних геномів ЦВС-II генотипу 2.2 показало наявність у них 18 консервативних ділянок, з яких 6 були придатними для розробки праймерів з метою генотипоспецифічної детекції. Аналіз зазначених консервативних фрагментів дозволив охарактеризувати 17 олігонуклеотидних пар, з яких для синтезу була обрана система праймерів PCV 2.2, яка обмежувала ділянку гена *gcp* довжиною 159 п.н. Відмінність утвореного фрагменту від

серотипоспецифічної та генотипоспецифічної (генотип 2.1.) ампліфікації теоретично дозволяла успішно диференціювати генотипи 2.1 та 2.2 на електрофореграмах.

Пошук консервативних фрагментів, властивих лише для генотипу 2.3, який у мережі GenBank був представлений лише 5 послідовностями показав наявність 7 ділянок різної довжини у вірусному геномі. Їх аналіз дозволив обрахувати дві праймерні пари, що мали високі показники якості при ПЛР-дослідженні. Натомість, обрана для синтезу була лише пара PCV 2.3, яка обмежувала фрагмент гена сар довжиною 300 п.н. Інша пара – PCV_2.3, що фланкувала ділянку 432 п.н. виявилася непридатною для роботи у форматі мультиплексної детекції, адже її продукт теоретично майже співпадав за довжиною з продуктом серотипоспецифічної ампліфікації (рис.).

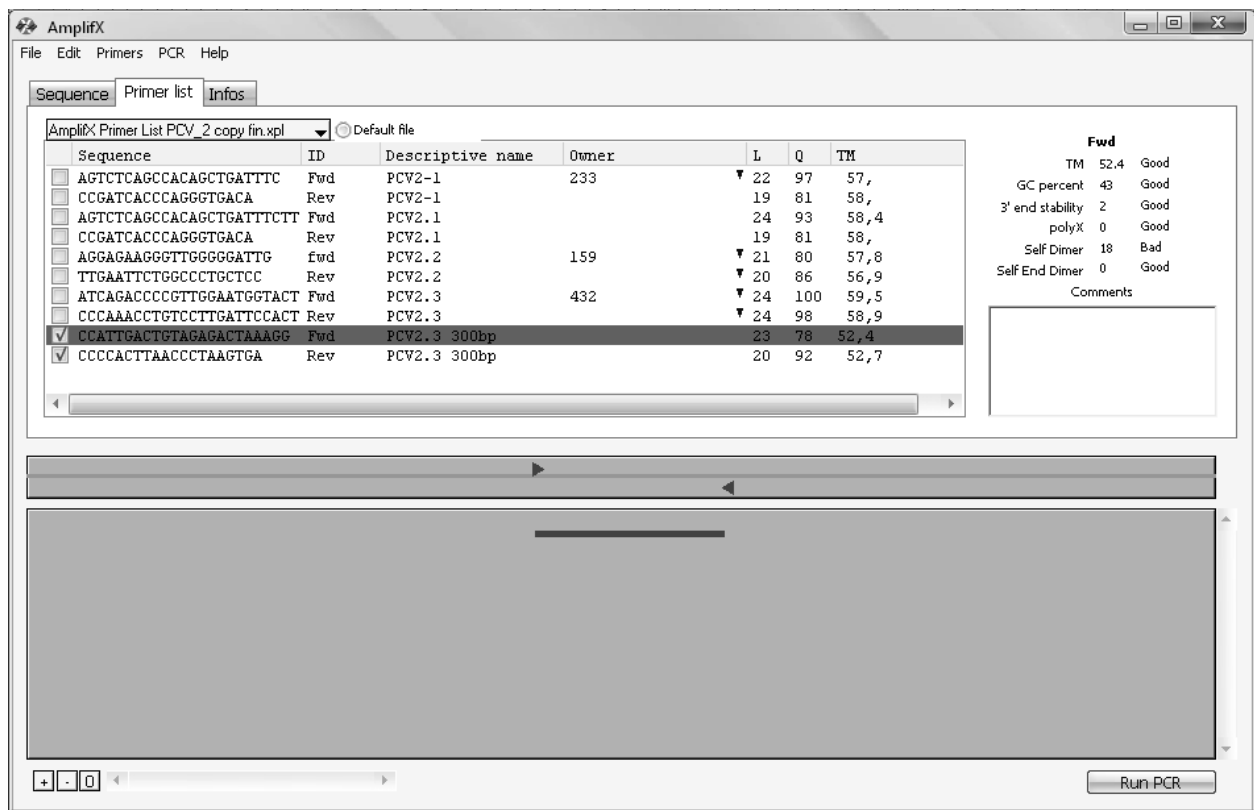


Рис. Праймерні системи для ідентифікації генотипів ЦВС-II 2.1, 2.2 та 2.3

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 2 °C (за винятком пари PCV 2.3, альтернативу якій складала олігонуклеотид системи PCV_2.3). Вони були на 100 % комплементарними до ДНК-матриць цирковірусів таргетних генотипів та мали відповідність у парі не вищу за 65-70 % та індивідуальну не вищу 75 % стосовно подібних та гетерологічних матриць.

Висновки. 1. За біоінформатичним аналізом фрагментів геномів цирковірусів типу II різних генотипів встановлено, що для диференціації генотипів збудника як таргетні можуть бути використані обидва основні гени.

2. З метою генотипоспецифічної ампліфікації ДНК ЦВС-II були розроблені праймерні системи PCV 2.1, PCV 2.2., PCV_2.3 та PCV 2.3, що фланкують ділянки довжинами 233, 159, 300 та 432 п.н. та характеризуються високою передбаченою специфічністю детекції і задовільними показниками ПЛР-quality.

Перспективи подальших досліджень. На основі отриманих результатів зі створення праймерних систем для виявлення ЦВС-II та його генотипування в подальшому планується розробка методик з типування збудника в клінічних зразках та сировині тваринного походження за допомогою мультиплексної ПЛР.

Список літератури

1. Performance of fattening pigs in a farm infected with both porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and porcine circovirus type 2 following sow and piglet vaccination with an attenuated PRRS vaccine [Text] / S.K. Kritas [et al.] // J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. – 2007. – Vol. 54, № 6. – P. 287-291.
2. Porcine circovirus 2 replication in colostrum-deprived piglets following experimental infection and immune stimulation using a modified live vaccine against porcine respiratory and reproductive syndrome virus [Text] / G.M. Allan [et al.] // Zoonoses Public Health. – 2007. – Vol. 54, № 5. – P. 214-222.
3. Proc. Animal circoviruses and associated diseases [Text]: math. conference "Animal circoviruses and associated diseases", Belfast, UK, 11-14 Sept., 2005. – 116 p.
4. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR [Text] / J. Kim [et al.] // Vet Rec. – 2001. – Vol. 149, N 10. – P. 304-305.
5. Герілович, А. П. Вивчення філогенетичних особливостей ізолятів цирковірусу свиней, циркулюючих в різних регіонах світу та розрахунок праймерів для диференціації серотипів збудника [Текст] / А. П. Герілович // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. — Х., 2008. — Вип. 89. — С. 89-96.
6. 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.

BIO-INFORMATIVE DEVELOPMENT OF PRIMERS FOR PIG CIRCOVIRUS OF TYPE II TYPING BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Gerilovych A.P., Rudova N.G.

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

Porcine circoviral infection is widespread in most countries where pig production is developed. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) has several genotypes, determining which sets the origin of the virus. The article describes the results of research on assessment bioinformatics for PCV-2 genome polymorphism and the calculation of oligonucleotides to genotype 2.1, 2.2 and the new genotype 2.3. The theoretical research on the detection of latitude and intraspecific specificity of designed primers has been conducted.

УДК 57.043:578.71

РОЗРОБКА БІОЛОГІЧНО БЕЗПЕЧНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ТА ЗБЕРЕЖЕННЯ ВІРУСІВ І ВІРУСОВМІЩУЮЧОГО МАТЕРІАЛУ

Стегній М.Ю.

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

За вірулентною активністю віруси поділяються на три групи, кожній з яких установлюється визначений порядок обліку, зберігання, відпуску, транспортування та внутрішньо лабораторного поводження [4]. Розробка біологічно безпечних систем зберігання патогенного вірусного біоматеріалу за допомогою сучасних кріотехнологій необхідна для впровадження світових стандартів біобезпеки та біозахисту та запобігання поширенню збудників зоонозів та зооантропонозів [1, 2, 3].

Розробка біологічно безпечних кріотехнологій доставки вилученого інфекційного матеріалу вірусного походження для наступного збереження в умовах кріобанку включає й біологічно безпечну упаковку та ємності для кріоконсервування отриманих біоматеріалів з метою усунення можливості інфікування як дослідника, так і рідкого азоту патогенним матеріалом при розгерметизації упаковки.

Тому актуальною є розробка біологічно безпечних кріотехнологій кріоконсервування та збереження у рідкому азоті вилучених штамів з використанням біобезпечної упаковки вірусного біоматеріалу. Вилучені під час спалахів інфекційних захворювань штамми повинні зберігатись в кріобанку ННЦ «ІЕКВМ» для подальшої роботи з отримання з них вакцин та діагностиків. У зв'язку з цим нагальною проблемою стала розробка біобезпечних систем зберігання вірусних штамів збудників першої, другої та третьої групи патогенності для запобігання витоку інфекційного біоматеріалу в навколишнє середовище, а також впровадження світових стандартів біобезпеки та біозахисту з метою запобігання поширенню збудників зоонозів та зооантропонозів. Розробка біологічно безпечної технології доставки та наступного збереження в умовах кріобанку вірусного матеріалу обумовлена фізичними властивостями рідкого азоту і, перш за все, його кипінням, навіть, у посудині Д'юара, що приводить до перемішування всіх шарів рідини. Тому у випадку порушення хоча б однієї упаковки з вірусним матеріалом відбувається контамінація усіх поверхонь посудини. Таким чином, основним пунктом, що визначає рівень біологічної безпеки кріоконсервування є надійність герметизації вірусного матеріалу всередині кріоупаковки.

У процесі епізоотологічного моніторингу вірусних захворювань на території України отриманий діагностичний біоматеріал кріоконсервується в польових умовах з послідуною доставкою в лабораторії. Саме тому розробка біологічно безпечних кріотехнологій зберігання патогенного біоматеріалу починається з цього етапу. Під час попередньої роботи нами були розроблені способи кріоконсервування вірусів інфекційного ринотрахеїту та кріоконсервування вірусу хвороби Марека. Отримано дані щодо впливу режимів заморожування на біологічні властивості вірусів. Необхідна розробка біологічно безпечної упаковки та ємностей для кріоконсервування отриманих вірусних біоматеріалів з метою усунення можливості інфікування як дослідника, так і контамінації рідкого азоту патогенним матеріалом при розгерметизації упаковки.

Мета цієї роботи – розробити біологічно безпечні технології кріоконсервування, збереження та відтавання вірусних патогенів з наступною розробкою автоматизованої електронної системи контролю вірусних патогенів кріобанку ННЦ «ІЕКВМ».

Матеріали та методи. Дослідження проводились на моделі вірусу хвороби Марека, який відноситься до збудників другої групи патогенності [4]. З метою виділення польових ізолятів вірусу хвороби Марека (ВХМ) нами було відібрано вірусоміщуючий матеріал. Матеріал для індикації ВХМ відбирали від птиці з клінічними ознаками ХМ, яку забивали з діагностичною метою, також користувалися патологічним матеріалом від щойно загиблої птиці.

Найбільш придатним матеріалом для вірусологічних досліджень є цільна гепаризована кров, яку відбирали у стерильні пробірки з яремної вени. Для цього птицю фіксували у положенні головою вниз, ножицями зрізували пір'я з латеро-вентральної поверхні шиї, шкіру протирали ватним тампоном, змоченим спиртом, розрізали шкіру стерильними ножицями в каудо-краніальному напрямку. Далі знаходили вену, розрізали її ножицями та збирали кров до пробірки в яку заздалегідь вносили 1-2 краплі гепарину. В одну пробірку набирали не більше 3-5 мл крові, щоб попередити її згортання. При розтині відбирали селезінку, печінку або фабрицієву бурсу.

Для виділення вірусу з епітеліальної тканини пульпи пір'я з трупа птиці висмикували 25-50 махових пір'їн крила чи спини, ножицями зрізували колодочки. Означений патологічний матеріал був розфасований в стерильні кріоконтейнери, що випробували. В якості кріоконтейнерів випробували скляні ампули, поліпропіленові контейнери з кришками, що загвинчуються та силіконовими прокладками, або полістиролові флакони з кришками, що нагвинчуються та полістиролові трубки, що запаюються. Кріоконтейнери занурювали у рідкий азот. Відібраний патологічний матеріал доставляли для дослідження в посудини Д'юара.

Ефективність біобезпеки упаковки, що використовували при кріоконсервуванні, оцінювали згідно дотримання вимог щодо біобезпеки упаковки, а саме: зведення до мінімуму людського фактору при герметизації, надійності, зносостійкості та кратності використання.

Результати досліджень. Розробка біологічно безпечної технології упаковки, доставки та наступного збереження в умовах кріобанків вірусного матеріалу передбачає вимоги, які пред'являються до ємностей для кріоконсервування, а саме: забезпечення належної герметичності протягом усіх маніпуляцій при кріоконсервуванні, біологічна інертність, висока теплопровідність. Однак на практиці виконання вищезазначених вимог ускладнювалося повним або частковим руйнуванням матеріалу упаковки, надтекучістю рідкого азоту, який проникає навіть в мікротріщини, та людським фактором. Тому ми розробили метод подвійної, або багат шарової герметизації вірусного матеріалу при його доставці та зберіганні у рідкому азоті в умовах кріобанку. Для цього використовували