

УДК 639.09:579.62:579.88.001.891:577.231

РОЗРОБКА СПЕЦИФІЧНИХ ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ І ГЕНОТИПУВАННЯ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ СВИНЕЙ У ПОЛІМЕРАЗНО-ЛАНЦЮГОВІЙ РЕАКЦІЇ

Гаврасьєва Н.В., к. вет. н., науковий співробітник, *gari-nata@ukr.net*;
Головко А.М., академік НААН України, директор, *anatolii_golovko@mail.ru*;
Кацімон В.В. науковий співробітник, *ww12@yandex.ru*

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ), м. Київ.

Анотація. Проведено пошук нуклеотидних послідовностей ORF 7 рибосомальної РНК вірусу РРСС для наступного аналізу їх варіабельності та пошуку консервативних ділянок, необхідних для підбору праймерів. Розроблено 2 специфічні пари праймери для генотипування репродуктивно-респіраторного синдрому. Відпрацьовано умови проведення ампліфікації. Визначено оптимальну температуру відпалу праймерів. Перевірено чутливість та специфічність праймерів.

Ключові слова: репродуктивно-респіраторний синдром свиней (РРСС), полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР), праймери.

Актуальність проблеми. Респіраторні хвороби свиней широко поширені у всіх країнах світу і завдають великої шкоди через високу захворюваність та летальність. Ці хвороби реєструють в основному у 1,5-4-місячних поросят, захворюваність може сягати від 30 до 70%, а летальність - 40% [1].

Репродуктивно-респіраторний синдром свиней — одна з досить поширених у світі контагіозних інфекцій, що характеризується пізніми абортами, передчасними пологами, прохолостами свиноматок, народженням мертвих, муміфікованих, нежиттєздатних поросят, загибеллю новонароджених й ураженням органів дихання у поросят-сисунів.

Діагностувати РРСС досить складно, адже ця хвороба часто перебігає в асоціації з іншими інфекціями (парвовірусною; рота-, корона-і ентеровірусною, хворобою Ауескі та ін.) [2].

Молекулярно - генетичні методи діагностики інфекційних хвороб, в тому числі і ПЛР, на сьогоднішній день є найбільш високочутливим лабораторним методом [3]. Аналіз базується на визначенні у досліджуваному матеріалі специфічних для даного збудника нуклеотидних послідовностей його геному

Присутність геному вірусу в патологічному матеріалі або антитіл в сироватці крові поросят до прийому ними молозива, або у транссудаті мертвонароджених (абортіваних плодів) свідчить про неблагополуччя господарства до вірусу РРСС [4,6].

Завдання дослідження. Розробити чутливі та специфічні праймери для генотипування РРСС та оптимізувати умови проведення ПЛР для виявлення нуклеїнової кислоти.

Матеріал і методи дослідження. Для проведення ПЛР досліджували зразки ДНК виділених з перещеплюваної культури клітин MARC-145, яка була інфікована референтними штамми вірусу РРСС європейського (Lelystadt) і американського (Hesse) типів. Титр штаму Lelystadt склав - 4,0 lg ТЦД₅₀/см³, а Hesse - 5, 5 lg ТЦД₅₀/см³. Живі вакцини («Порциліс РРСС» фірма Інтервет «Амервак - PRRS», фірма Хіпра).

На основі літературних даних і аналізу нуклеотидних послідовностей представлена в базі даних GeneBank, EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека), DDBJ (Японська база даних нуклеотидних послідовностей) і PDB sequences в якості мішені вибран ген ORF 7 [5,7].

Для ампліфікації РНК вірусу американського генотипу вибрали специфічну пару праймерів Nor 1 (ggCgCAgTgACTAAgAgA) довжина 18 н.з. і Nor 2 (gTAACTCTGAACACCATATgCtg) довжина 21н.з..

Для ампліфікації РНК вірусу європейського генотипу вибрали специфічну пару праймерів Eur1 (gTATgAACTTgCAggATg) довжина 18 н.з. і Eur2 (gCCgACAATACCATgTgCTg) довжина 20 н.з.

На стадії виділення нуклеїнової кислоти нами було апробовано декілька методів та їх модифікацій. Для виділення РНК вірусів обрано метод із застосуванням розчину гуанідин ізотіоціанату та сорбенту. РНК з досліджуваних проб виділяли за допомогою набору « РНК-сорб – В » (ЦНДІ Епідеміології, Москва), в основі якого лежить метод сорбції на силікагелі.

З виділеної РНК отримували кДНК за допомогою реакції зворотної транскрипції (ЗТ). ПЛР проводили на ампліфікаторі (термоциклері) з режимом активного регулювання «Biometra» («Whatman Biometra», Німеччина) за Saiki R. et al. До компонентів реакційної суміші об'ємом 25 мкл входили: 67 ммоль трис – HCl (рН 8,6), 16,6 М(NH₄)₂SO₄, 2,0 ммоль MgCl₂, 0,01 % твін-20, по100 мкмольд АТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, по1,5 мкл кожного з специфічних праймерів, 2 од. Та q-полімерази, по10 мкл зразків виділеної кДНК. Кількість циклів ампліфікації складала — 35 (табл. 1). Кожний цикл , в свою чергу, складався із таких етапів: ; денатурація кДНК при 94 °С — 30 сек.; відпал праймерів при температурі 58 °С — 30 сек.; синтез комплементарних ланцюгів при 72 °С — 30 сек. Початкову стадію денатурації та кінцеву стадію елонгації було подовжено до 3 хвилин.

Детекцію продуктів ампліфікації проводили методом електрофорезу в агарозному гелі, забарвленому бромідом етидія, з використанням трис-боратного буфера при градієнті напруги10 В /см³.

Результати дослідження. Експериментальна перевірка розрахунку температурних режимів проводилась з використанням трьох температурних режимів відпалу, а саме 55, 58 та 61 °С.

Пара праймерів Nor 1 (forward) та Nor 2 (reverse) вступала до реакції з кДНК штаму Hesse за температурних режимів 55°С та 58°С ледь помітний продукт ампліфікації спостерігався за температури 61 °С. Це вказувало на те, що за температури відпалу 61 °С амплікони утворювались у незначній кількості або були зовсім відсутні.

Пара праймерів Eur1 (forward) та Eur2 (reverse) вступала до реакції з кДНК штаму Lelystadt за температурних режимів 55°С та 58°С, 61°С і при кожній вказаній температурі амплікони утворювались у значній кількості.

Для виявлення чутливості використовували десятикратні розведення референт-вірусів Lelystad та Hessa. Титр вірусу Lelystad 4.5 lg ТЦД50/см3 і Hessa - 5.5 lg ТЦД50/см3. Чіткі специфічні смужки на трансільюмінаторі проявлялись у діапазоні розведення 10⁻³ штаму Lelystadt, а штаму Hesse — 10⁻⁴. Ледь помітні смужки були у більш високих розведеннях референтних штамів вірусу РРСС. Отримані результати свідчать про високу чутливість праймерів розробленого діагностичного набору.

Для визначення відтворюваності позитивні проби досліджували у 3 повторях електрофоретичного аналізу. Інтенсивність світіння та довжина ампліфікованого ПЛР-продукту були однаковими та виявлялись аналогічно позитивному контролю.

Специфічність розроблених праймерів була підтверджена шляхом використання різних штамів вірусів і бактерій, які викликають схожі клінічні симптоми з вірусом РРСС, а саме хвороба Ауескі, класична чума свиней, сальмонельоз, мікоплазмоз, а також зразки які вміщують вірус РРСС: вакцина «Порциліс РРСС» фірма Інтервет, вакцина «Амервак – РRRS», фірма Хіпра, референтні штами РРСС - Lelystad та Hessa. Характерний продукт ампліфікації був установлений у позитивних пробах референтних штамів РРСС та вакцинах «Порциліс РРСС» і «Амервак – РRRS». При цьому у пробах, що відповідають бактеріальним і вірусним штамам, продукти ампліфікації були відсутні, що свідчить про специфічність праймерів.

Висновки

1. Розроблено 2 пари праймерів Nor 1 і Nor 2 та Eur1 і Eur2 для виявлення і генотипування вірусу РРСС в ПЛР, де в якості мішені вибран ген ORF 7.

2. Відпрацьовано температурні режими відпалу праймерів, а саме 55°С, 58°С, 61°С

3. Доведено чутливість та специфічність розроблених праймерів.

Література

1. *Laboratory investigation of PRRS virus infection in three swine herds* [Text] / D. Zeman [et al.] // J. Vet. Diagn. — 1993. — Vol. 5. — P. 522–528.
2. *Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV* [Text] / J. J. Meulenber [et al.] // Virology. — 1993. — Vol. 192. — P. 62–74.
1. *Kissing interaction between 30 noncoding and coding sequences is essential for porcine arterivirus RNA replication* [Text] / M. H. Verheije [et al.] // J. Virol. — 2002. — Vol. 76, № 3. — P. 1521–1526.
2. *Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States* [Text] / S. L. Ropp [et al.] // J. Virol. — 2004. — Vol. 7. — P. 3684–3703.
3. *Hasnoot, P. C. Inhibition of virus replication by RNA interference* [Text] / P. C. Hasnoot, D. Cupac, B. Berkhout // J. Biomed. Sci. — 2003. — Vol. 10. — P. 607–616.
4. *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection* [Text] / R. Allende [et al.] // Virol. — 2000. — Vol. 74, № 22. — P. 10834–10837.

5. 7. *Mardassi, H.* Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [Text] / H. Mardassi, B. Massie, S. Dea // *Virology*. — 1996. — Vol. 221, № 1. — P. 98–112.

РАЗРАБОТКА СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ В ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ.

Гаврасьева Н.В., к. вет. н., научный сотрудник, gari-nata@ukr.net;

Головко А.Н., академик НААН Украины, директор, anatolii_golovko@mail.ru;

Кацимон В.В., научный сотрудник, ww12@yandex.ru

Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов (ГНКИБШМ), г. Киев.

Аннотация. Проведен поиск нуклеотидных последовательностей ORF 7 рибосомальной РНК вируса РРСС для последующего анализа их вариабельности и поиска консервативных участков, необходимых для подбора праймеров. Разработаны 2 специфические пары праймеров для генотипирования репродуктивно-респираторного синдрома. Отработано условия проведения амплификации. Определена оптимальную температуру отжига праймеров. Проверено чувствительность и специфичность праймеров. Ключевые слова: репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС), полимеразно-цепная реакция (ПЦР), праймеры.

DEVELOPING OF PRIMERS FOR GENOTYPING OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS WITH OF POLYMERASE CHAIN REACTION.

Gavruseva N.V., gari-nata@ukr.net;

Golovko A. M., anatolii_golovko@mail.ru; Katsymon V.V., ww12@yandex.ru

State Scientific - Control Institute of Biotechnology and Microorganisms strains, Kiev.

Summary. The search of nucleotide sequences ORF 7 of ribosomal of PRRS virus have processed to carry out an analysis of their variability and to make search of conservative fields are necessary for assorting of polymerase chain reaction (PCR) primers. Also 2 pairs specific of primers have been developed for genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Spent different primer annealing temperatures. The optimum annealing temperature of primers. Verified the sensitivity and specificity of primers.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome, polymerase chain reaction, primers.

УДК: 319:616.98:582.24:615.37

ИМУНОСТИМУЛЯЦІЯ ПРОПОЛІСОМ ПРИ АКТИНОМІКОЗІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Гринченко Д.М. к. вет. н., доцент,

Білоконов І.І. к. біол. н., доцент.

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Анотація. Прополіс, як продукт бджільництва, має виражений імуностимулюючий ефект при актиномікозі великої рогатої худоби при парентеральному введенні.

Ефективнішим виявилось місцеве застосування прополісу шляхом циркулярного обколювання актиномікоми і промивання гнійних фокусів через відкриті свищі актиномікозної гранулеми.

Ключові слова: актиномікоз, імунodefіцит, імуностимуляція, прополіс, екстракт.

Актуальність проблеми. Однією з актуальних та пріоритетних завдань сільськогосподарських спеціалістів є підвищення продуктивності тварин та збільшення кількості та якості тваринницької продукції. Цьому в значній мірі заважає високий рівень захворюваності та загибелі тварин від інфекційних захворювань. Ветеринарна служба робить багато зусиль для ліквідації інфекційних захворювань, але є захворювання, які і нині спричиняють тваринництву значні економічні збитки. Одним із таких захворювань є актиномікоз великої рогатої худоби [2, 6].