

**П. С. ЮРКО,**

**Г. В. БЛЕЦЬКА,** кандидат біологічних наук

**Р. О. КУЛБАБА,** кандидат сільськогосподарських наук

*Інститут тваринництва НААН (м. Харків)*

### **ЗАСТОСУВАННЯ ДУПЛЕКСНОЇ ПЛР ПРИ ВИРОБНИЦТВІ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ВІРУСНОГО ЕНТЕРИТУ ГУСЕЙ (ХВОРОБИ ДЕРЖІ)**

*У статті описано використання дуплексної ПЛР для визначення наявності поліомавірусу гусей як контамінанту інактивованої вакцини проти хвороби Держі. Показана необхідність контролю контамінації вакцини на різних технологічних етапах виробництва біопрепарату з використанням сучасних молекулярно-генетичних методів.*

*Ключові слова: вірусний ентерит гусей, парвовірус, поліомавірус, полімерна ланцюгова реакція, дуплексна ПЛР.*

У сучасному птахівництві профілактика захворювань птиці займає значну долю у загальному обігу засобів. При цьому найбільш важливою складовою загальної стратегії профілактики захворювань є виготовлення різних вакцин проти найбільш розповсюджених захворювань птиці. Так, наприклад, частка вакцинних препаратів за даними 2004 року склала 21 % від загального ринку ветеринарної медицини [1]. Ефективність вакцини визначається рядом факторів: імуногенність, нешкідливість, стерильність та, у тому числі, відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою. Біопрепарат, що застосовується, повинен бути безпечним, ефективним та вільним від біологічних контамінантів, таких як бактерії, гриби або віруси [2]. З розвитком сучасних методів досліджень удосконалюються технології виготовлення вакцин, однак проблема контамінації сторонньою мікрофлорою як і раніше актуальна, так як частина технологічних процесів має «відкритий характер» та навіть при дотриманні усіх правил асептики існує загроза забруднення готової продукції [3, 4].

В Україні контроль якості вакцин проводиться згідно вимог GMP (Good Manufacturing Practice, належна виробнича практика), «Положення про проведення державного контролю та нагляду за якістю ветеринарних препаратів, субстанцій, готових кормів, кормових добавок та засобів ветеринарної медицини, які застосовуються в Україні», «Перелік показників якості для ветеринарних імунобіологічних засобів», а також національних стандартів (ДСТУ) [5, 6, 7]. Так, для контролю контамінації сторонніми вірусами на території України застосовується ДСТУ 4517:2006. Однак у ньому описується застосування тільки стандартних методик та вказана досить обмежена кількість вірусів-контамінантів при виробництві вакцин для птиці [8].

В Інституті птахівництва НААН розроблена та виготовляється інактивована вакцина проти вірусного ентериту гусей (реєстраційне посвідчення № ВВ-00337-02-11 від 01.07.2011 року). Технологічна схема виготовлення вакцини наведена на

рисунку 1. В якості антигену при виготовленні біопрепарату використовується патогенний для гусенят штам ХМ-99 вірусу ентериту гусей (Goose ParvoVirus, GPV), який отримано від гусенят загиблих з характерною для вірусного ентериту патологоанатомічною картиною та адаптовано до культури фібробластів ембріонів гусей шляхом проведення послідовних пасажів. Отриманий виробничий штам підтримується та розмножується для отримання вірусутримуючої рідини у культурі клітин. Культуральна вірусутримуюча рідина у об'ємі, достатньому для виготовлення однієї серії біопрепарату, інактивується етиленіміном та об'єднується з ад'ювантом згідно інструкції з виготовлення та контролю інактивованої вакцини проти вірусного ентериту гусей [9].

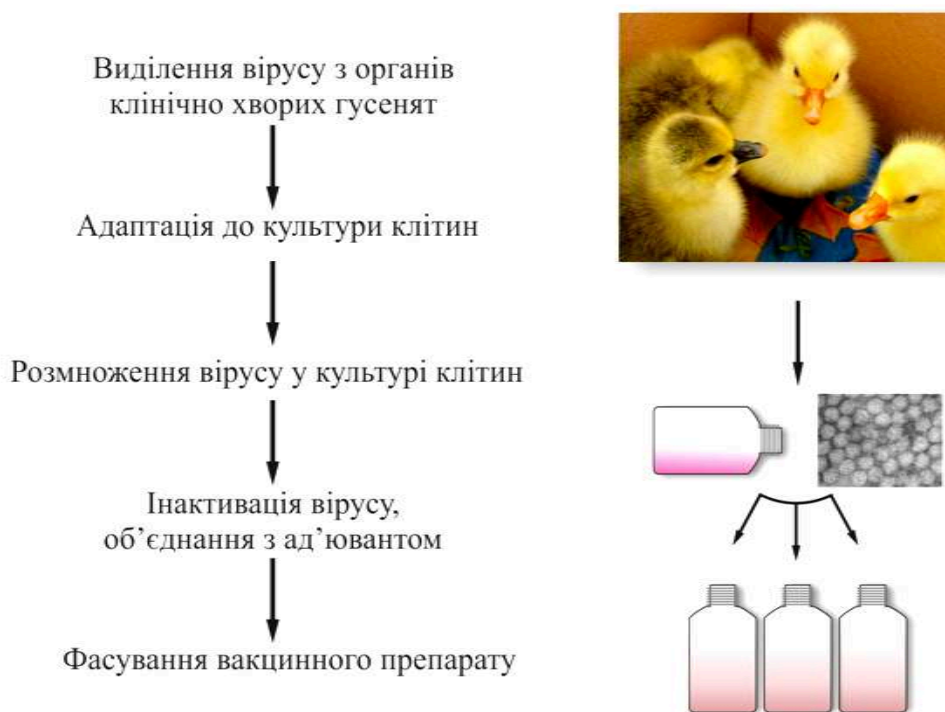


Рис. 1. Технологічна схема виготовлення інактивованої вакцини проти вірусного ентериту гусей

Більшість процесів має «відкритий характер» та у зв'язку з цим край необхідно здійснювати контроль щодо контамінації сторонніми вірусами на кожному із етапів. У випадку з вакциною проти парвовірусного ентериту найбільш вірогідним та небезпечним вірусом-контаміантом може виступати поліомавірус гусей (Goose Hemorrhagic PolyomaVirus, GHPV), який викликає геморагічний нефрит-ентерит гусей (ГНЕГ; Hemorrhagic Nephritis Enteritis of Geese, HNEG). Унаслідок подібності цих вірусів та практично неможливої ідентифікації з використанням загальноприйнятих методик (гусячі ембріони, культура клітин), необхідно застосування молекулярно-генетичних методів (які на даний момент є єдиною альтернативою), таких як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). У лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики

Інституту тваринництва НААН розроблено метод дуплексної ПЛР, який дозволяє швидко та ефективно визначити наявність геномів парво- та поліомавірусів у дослідному матеріалі. З використанням даного методу вперше в Україні було ідентифіковано збудник поліомавірусної інфекції у більш ніж 40 % досліджених господарств, що становить дане захворювання у один ряд з найбільш розповсюдженими хворобами гусей [10]. Виходячи із усього вищенаведеного, стає зрозумілою небезпека контамінації вакцини проти парвовірусного ентериту поліомавірусом, що призводить до необхідності розробки заходів стосовно своєчасного виявлення генетичного матеріалу стороннього вірусу на різних етапах виробництва вакцини.

Таким чином, **мета** даної роботи – застосування методу дуплексної ПЛР у якості контролю контамінації матеріалу поліомавірусом на різних етапах виробництва інактивованої вакцини проти хвороби Держі.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводили у лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики Інституту тваринництва НААН.

Для проведення досліджень використовували: зразки тканин кишечника, печінки та шлунку; суспензії органів інфікованих гусенят, культуральну вірусотримуючу рідину.

ДНК із біологічного матеріалу виділяли за допомогою набору реагентів «ускоренная пробоподготовка» та «ДНК Сорб-В» (Амплісенс, Росія) згідно інструкцій із застосування. ПЛР проводили за допомогою реагентів DreamTaq Green PCR MasterMix (2x) (Thermo Scientific) з використанням термоциклеру «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). Об'єм кінцевої суміші склав 20  $\mu\text{L}$ , концентрація праймерів – 0,1  $\mu\text{M}$ . Для проведення дуплексної ПЛР використовували праймери, фланкуючі консервативну ділянку гену VP1 (GHPV) та VP3 (GPV). Для контролю контамінації використовували негативний контрольний зразок. Ампліфікацію проводили згідно схеми (табл. 1).

Таблиця 1

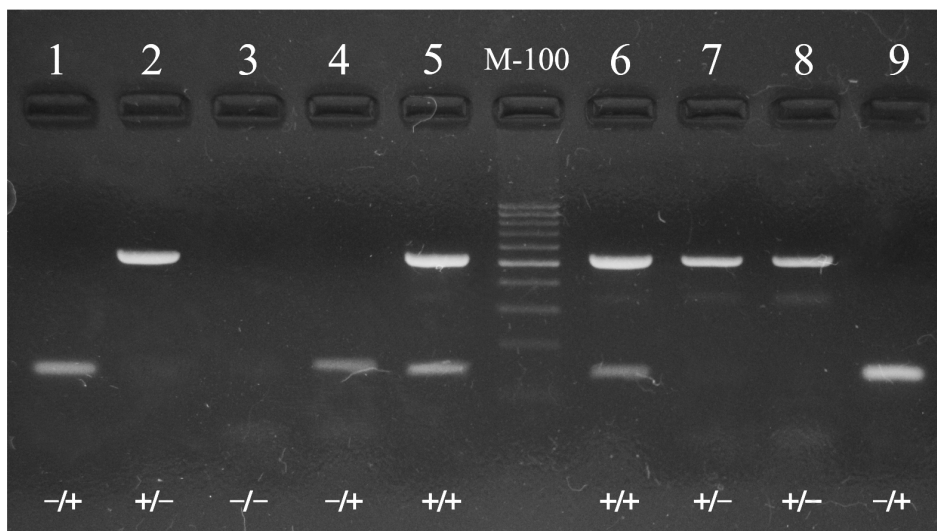
### Програма ампліфікації для проведення дуплексної ПЛР

Стадія ПЛР	Денатурація		Віджиг	Елонгація	
Збудник	35 циклів				
<b>GPV+</b> <b>GHPV</b>	94°C (5 хв)	94°C (45 с)	60°C (45 с)	72°C (45 с)	72°C (5 хв)

Електрофорез продуктів ампліфікації проводили з використанням 1,5 % агарозного гелю протягом 45 хв. при 120 V. Проби візуалізували з використанням броміду етидія в ультрафіолетовому спектрі. Розмір ампліфікованих фрагментів визначали з використанням маркера молекулярних мас M-100. Наявність на електрофореграмі фрагментів ДНК розміром 539 та 144 п.н. вказує на присутність у пробі геномів як парво-, так і поліомавірусу; тільки 539 п.н. – парвовірусу; 144 – поліомавірусу.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Загальна кількість досліджених зразків склала 30 проб – це зразки органів загиблих гусенят з характерною для вірусного ентериту патологоанатомічною картиною, отриманих з господарств різних областей України; 10 % суспензії органів загиблих також з характерною для вірусного ентериту патологоанатомічною картиною гусенят; неінфіковані

культури клітин фібробластів ембріонів гусей; матрова розплодка штаму ХМ-99; вірусотримуюча культуральна рідина. На рисунку 2 наведено приклад електрофореграми продуктів ампліфікації фрагментів ДНК парво- та поліомавірусів.



**Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації фрагментів ДНК парво- та поліомавірусів із зразків тканин, суспензій органів гусенят та культуральної вірусотримуючої рідини:**

1 – 9 – номери проб; М-100 – маркер молекулярних мас; +/+ – наявність GPV та GHPV; +/- – тільки GPV; -/+ – тільки GHPV; -/- – відсутність GPV та GHPV.

Як бачимо на рис. 2 у пробах 5 та 6 виявлені фрагменти ДНК як парво-, так і поліомавірусів; у пробах 1, 4 та 9 – тільки поліомавірусу; у пробах 2, 7, 8 – тільки парвовірусу; у 3 пробі немає фрагментів ДНК обох вірусів.

При дослідженні органів гусенят, одержаних з деяких гусівничих господарств України, у яких спостерігалась характерна для вірусного ентериту патологоанатомічна картина, на рівні із парвовірусом виявлено геном поліомавірусу, що свідчить про циркуляцію цього вірусу в Україні та можливість контамінації сировини для виробництва вакцини (ембріонів гусей та гусенят). При отриманні суспензії з органів загиблих гусенят та інфікуванні нею культури клітин фібробластів з проведенням послідовних сліпих пасажів спостерігали подальшу індикацію поліомавірусу як вірусу-контамінанту в культурі фібробластів ембріонів гусей. В контрольній же культурі фібробластів ембріонів гусей даний вірус-контамінант не виявлявся. Слід відзначити, що в матровій розплідці виробничого патогенного штаму ХМ-99 не було виявлено геному поліомавірусу, що свідчить про відсутність контамінації небезпечним вірусом та дає можливість використовувати розплідку для виготовлення інактивованої вакцини проти вірусного ентериту гусей (хвороби Держі). Однак, контамінація матеріалу можлива як на етапі інфікування гусенят при «освіженні» вірусу, так і при розмноженні його на культурі фібробластів ембріонів гусей.

Таким чином, метод дуплексної ПЛР дозволяє проводити контроль контамінації вірусутримуючого матеріалу на етапах «освіження» штаму та після накопичення культуральної вірусутримуючої рідини перед інактивацією, що дозволить запобігти зараження вакцини небезпечним для гусей збудником геморагічного нефрит-ентериту.

**Висновки:** 1. Для контролю контамінації вакцин доцільно використовувати молекулярно-генетичні методи, які дозволяють з високим ступенем точності визначити наявність геному стороннього вірусу у дослідному матеріалі.

2. Контроль інактивованої вакцини проти вірусного ентериту гусей (хвороби Держі) на контамінацію поліомавірусом методом дуплексної ПЛР на етапах «освіження» вірусу та отримання вірусутримуючої рідини дозволяє отримати вільний від сторонніх вірусів біопрепарат.

### Список використаної літератури

1. *O'Brien D.* Animal vaccination and the veterinary pharmaceutical industry / D. O'Brien, S. Zanker // *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* – 2007. – V. 26 (2). – P. 471 – 477.
2. *Todd J. I.* Good manufacturing practice for immunological veterinary medicinal products / J. I. Todd // *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* – 2007. – V. 26 (1). – P. 135 – 145.
3. Detection of reticuloendotheliosis virus as a contaminant of fowl pox vaccines / A. M. Awad , H. S. Abd El-Hamid , A. A. Abou Rawash [et al] // *Poultry Science.* – 2010. – V. 89. – P. 2389 – 2395.
4. Quantitative PCR: a quality control assay for estimation of viable virus content in live attenuated goat pox vaccine / D. J. Kallesh, M. Hosamani, V. Balamurugan [et al] // *Indian Journal of Experimental Biology.* – 2009. – V. 47. – P. 911–915.
5. Наказ № 39 від 28.05.2003р. про затвердження Положення про проведення державного контролю та нагляду за якістю ветеринарних препаратів, субстанцій, готових кормів, кормових добавок та засобів ветеринарної медицини, які застосовуються в Україні.
6. Належна виробнича практика та належна дистрибуторська практика ветеринарних препаратів/ За ред. А. М. Головка, П. І. Вербицького – К.: Реферат, 2003. – 96 с.
7. *Ушкалов В. О.* Напрямки вирішення проблеми стандартизації системи виробництва ветеринарних біологічних препаратів / В. О. Ушкалов, А. М. Головка, О. О. Напненко // *Ветеринарна біотехнологія : бюлетень.* – К. : Дорадо. – 2008. – N 13 (том 1) : Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. "Сучасні проблеми біотехнології, стандартизації та забезпечення контролю якості ветеринарних препаратів, кормів та кормових добавок", присвяч. 10-річчю Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. – С. 363–367.
8. ДСТУ 4517:2006 Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи виявлення контамінації сторонніми вірусами // *Держспоживстандарт України.* – Київ. – 2007. – 10 с.
9. Інструкція з виготовлення та контролю інактивованої вакцини проти вірусного ентериту гусей / Безрукава І. Ю., Білецька Г. В., Юрко П. С. – 21 с.
10. *Кулибаба Р. А.* Вирусный энтерит гусей: болезнь Держи или полиомавирусная инфекция? / Р. А. Кулибаба, П. С. Юрко, А. В. Белецкая // *Птахівництво: Міжвід. тем. наук. зб..* – Харків, 2010. – В. 68. – С. 263 – 267.

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДУПЛЕКСНОЙ ПЦР ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ИНАКТИВОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА ГУСЕЙ (БОЛЕЗНИ ДЕРЖИ) / П. С. Юрко**

*В статье описано использование дуплексной ПЦР для определения наличия полиомавируса гусей как контаминанта инактивированной вакцины против болезни Держи. Показана необходимость контроля контаминации вакцины на разных технологических этапах производства биопрепарата с использованием современных молекулярно-генетических методов.*

*Ключевые слова: вирусный энтерит гусей, парвовирус, полиомавирус, полимеразная цепная реакция, дуплексная ПЦР.*

## **APPLICATION OF THE DUPLEX PCR FOR INACTIVATED VACCINE PRODUCTION AGAINST THE VIRAL ENTERITIS OF GEESE (DERZSY'S DISEASE)/ P. S. Yurko**

*Application of the duplex PCR method for the detection of the goose polyomavirus as contaminant of inactivated vaccine against Derzsy's disease is shown. Studies show the control necessity at vaccine productions using modern molecular genetic methods.*

*Keywords: goose enteritis, parvovirus, polyomavirus, polymerase chain reaction, duplex PCR.*

**Рецензент** – кандидат ветеринарных наук, член.-корреспондент НААН України **А. Ф. Ображей**