

Розділ 2. Загальні питання та новітні методи в біотехнології

Геном, що містив серотипспецифічні 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 % серотипспецифічність 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 *flfC*. 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 таргетного 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 *flfC* відповідно.

2. З метою родо- та серотипспецифічної 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 серотипспецифічних 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'Acoust, J. Y. Pathogenicity of foodborne *Salmonella* [text] / J.Y. D'AcoustInt. // 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].

Сперма бугаїв-плідників є одним з основних факторів передачі інфекції та їх поширення серед сприйнятливої поголів'я ВРХ. У спеціальній літературі міститься чимало відомостей про передачу мікоплазм, хламідій та збудників ВД ВРХ разом зі спермою [7-9]. Тому контроль сперми бугаїв-плідників є також важливим завданням ветеринарної служби, оскільки своєчасно впроваджені заходи зі скринінгу контамінації мікоплазмами та збудником ВД ВРХ здатні запобігти втраті продуктивності, збиткам та забезпечити ефективність галузі.

З метою виявлення контамінантів вірусної та мікоплазменної природи широкого застосування набули вірусологічні та бактеріологічні тести, які рекомендовані до впровадження у багатьох країнах світу, у т.ч. і в Україні. Проте, з огляду на дані щодо інфекційності вірусних геномів, система індикації контамінантів у культурах клітин та ветеринарних препаратах, особливо інактивованих антигенах, з використанням лише вірусологічних методів не є достатньо ефективною для виявлення неякісних партій сировини і готової продукції. У той же час, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є високочутливим та високоспецифічним методом, здатним виявляти генетичний матеріал інфекційного агенту навіть за межами чутливості традиційних методів. З огляду на зазначене, ряд міжнародних стандартів рекомендує проводити пряме виявлення збудника за наявності його нуклеїнових кислот. Це стосується як мікоплазменних, так і вірусних контамінантів [4, 5, 10].

У зв'язку з цим метою даної роботи було проведено молекулярно-генетичних досліджень щодо наявності вірусу діареї ВРХ та мікоплазм у різних видах біологічного матеріалу.

Матеріали і методи. У роботі застосовані зразки кріоконсервованої сперми ВРХ з різних господарств України, зразки розплодок вірусу діареї ВРХ штаму Oregon та ДНК референтних штамів *M. orale* N-1, *M. hyorhinis* BTS-7 та *M. bovis* PG45T, сировина для виготовлення ветеринарних препаратів, зразки клітинних культур.

Екстракцію нуклеїнових кислот проводили за допомогою методу афінної сорбції [11]. Зворотну транскрипцію з метою отримання кДНК на матриці РНК проводили з використанням комерційних наборів «GenePak RT-PCR Core» (ТОВ «Лабораторія Ізоген», Росія). Ампліфікацію проводили за допомогою систем праймерів BVDV_F/R для виявлення збудника вірусної діареї ВРХ [5] та F_1/2 [6] – для мікоплазм. При цьому протоколи проведення реакції оптимізували з огляду на температурні режими, кількість ампліфікаційних циклів, концентрацію праймерів та іонів магнію. Критерієм оптимального показника була чітка візуалізація ампліконів та уникнення неспецифічних продуктів реакції.

Облік результатів реакції проводили у променях УФ-світла після електрофорезу в 1% агарозному гелі за сили току 30 мА та напруги 15 В/см.

За допомогою оптимізованих методик перевіряли зразки сперми бугаїв-плідників, сировину для виготовлення імунобіологічних препаратів та зразки культури клітин FLK щодо контамінації вірусом діареї ВРХ та мікоплазмами.

Результати досліджень. На першому етапі проведеної роботи перевірено щодо контамінації 25 зразків сперми ВРХ. Для цього була ізольована ДНК і РНК. Потім були оптимізовані параметри визначення специфічних ділянок ДНК (РНК) збудників.

Експериментально було встановлено, що при ПЛР-детекції РНК збудника ВД ВРХ оптимальними є температура відпалу праймерів на рівні 57 °С, 40-45 циклів ампліфікації в присутності 20 пМ праймерів BVDV_F/R та 2,0 мМ/мкл іонів магнію у суміші. Зниження температури відпалу не призводило до збільшення чутливості тесту, проте знижувало її специфічність. Згадана вада супроводжувалась утворенням однієї або навіть комплексу додаткових смужок, відмінних за довжиною від 267 п.н., що відповідало розрахованій довжині.

Під час дослідів з різними кількостями специфічної ДНК встановлено, що протокол з індикації мікоплазм на основі праймерів F_1/2 має здатність до виявлення збудника в зразках, що відповідали розведенням до 100 клітин у мл, за умови 40-циклової ампліфікації та температури відпалу 55 °С, а також вмісту іонів магнію на рівні 1,5 мМ. У разі збільшення кількості циклів до 45-50 чутливість методики зростала. Специфічні фрагменти утворювались у діапазоні температур від 50 до 55 °С. Збільшення температури до 60 °С призводило до відсутності утворення продукту реакції через неможливість гібридизації вироджених праймерів. Оптимальним виявився їх вміст у реакційній суміші на рівні 8-10 пМ. Утворюваний за оптимальних умов продукт мав довжину від 450 до 483 п.н., що відповідало теоретичним розрахункам.

Серія експериментальних досліджень дозволила встановити чутливість методики, що складала 100 кл./мл для мікоплазм та 1 Іг/мл для ВД ВРХ.

За допомогою оптимізованої методики було досліджено 62 зразки сперми ВРХ, 90 ветеринарних імунобіологічних препаратів, 1084 зразки сировини для виготовлення нативної сироватки крові ВРХ та 37 культур клітин FLK (табл.). За проведеними дослідженнями встановлено, що 8 зразків сироватки крові до фільтраційної обробки були контаміновані мікоплазмами. Крім цього шість зразків містили генетичний матеріал вірусу діареї ВРХ. Після проведення деконтамінації сироваток, що містили мікоплазми, вони були повторно досліджені, та отримані результати показали відсутність контамінантів.

Таблиця – Результати дослідження контамінації мікоплазмами та збудником вірусної діареї ВРХ.

Об'єкт дослідження	Досліджено зразків	Результат	
		Вірус ВД ВРХ	Мікоплазми
Сперма ВРХ	62	Не виявлено	5
Імунологічні препарати	90	Не виявлено	Не виявлено
Сировина для виготовлення нативної сироватки крові ВРХ	1084	6	8
Культури клітин FLK	37	Не виявлено	2

Висновки.

1. Розроблені та оптимізовані методики виявлення генетичного матеріалу ВД ВРХ та мікоплазм у зразках сперми, культур клітин, сироватках крові ВРХ та імунобіологічних препаратах. При цьому встановлено, що чутливість методик складає 100 кл./мл для мікоплазм та 1 Іг/мл для ВД ВРХ.

2. За допомогою розроблених методик проведені дослідження зразків біологічного матеріалу, що дозволили виявити генетичний матеріал мікоплазм та вірусу діареї ВРХ в 8 та 6 зразках сировини для виготовлення нативної сироватки крові ВРХ відповідно.

Список літератури

1. Langdon, S.P. Cell culture contamination: an overview [Text] / S.P. Langdon // Methods Mol. Med. – 2004. – N 88. – P. 309-17. 2. Lincoln, C.K. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination [Text] / C.K. Lincoln, M.G. Gabridge // Methods Cell Biol. – 1998.

– N 57. – P.49-65. 3. Scott, F.W. Viral Cell cultures contamination [Text] / F.W. Scott // Cornell Vet/ - 1973. – N 63. – P. 536-560. 4. COMMISSION DECISION 2000/608/ES of 27 September 2000 concerning the guidance notes for risk assessment outlined in Annex III of Directive 90/219/EEC on the contained use of genetically modified micro-organisms [Text]. – 2000. – P.18. 5. Pauwels, K. Animal Cell Cultures: Risk Assessment and Biosafety Recommendations. [Text] / K. Pauwels [et al.] // Applied Biosafety - 2007. -Vol 12, N 1 – P. 27-39. 6. Levings, R.L. Bovine viral diarrhoea contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines [Text] / R.L. Levings, S.J. Wessman // Dev Biol Stand.-1991.-№ 75; P. 177-181. 7. Veznik, Z. Detection of chlamydiae in animal and human semen using direct immunofluorescence [Text] / Z. Veznik // Vet. Med (Praha). — 1996.- № 41(7).-P. 201-206. 8. Teankum, K. Prevalence of chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks [Text] / K. Teankum // Theriogenology. - 2007. - № 15;67(2). - P.303—10. 9. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals // O.I.E. 6th ed. - 2008. – V. 1-2. – 1343 p. 10. Vaccines (WHO Manual) // [Ел. ресурс] Режим доступу <http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/webhelp/Chapter 04/4 4 Cell culture problems identification and elimination.htm>. 11. Boom, R. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids. [Text] / R. Boom, C. Sol, M. Salimans et al.//Journal of Clinical Microbiology.–1990.–№ 28(3). – P.495-503

POLYMERASE CHAIN REACTION IN THE CONTROL OF VIRAL AND MYCOPLASMA CONTAMINATION OF OBJECTS VETERINARY SUPERVISION

Goraychuk I.V., Bolotin V.I., Gerilovich A.P. Korovin, I.V.

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

At the present work it was developed and optimized the methods for molecular-genetic studies according to the presence of bovine virus diarrhoea and mycoplasma in various kinds of biological material. 62 samples of semen, 90 veterinary immunobiological products, 1,084 samples of raw materials for production of native bovine serum and 37 cell cultures of FLK were studied by these methods. It was established that 8 samples of blood serum were contaminated by mycoplasma and 6 contained genetic material of bovine virus diarrhoea.

УДК 636.09:544.722.12

ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ СТАДІЇ ДОСУШУВАННЯ ПРОЦЕСУ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ *E.coli* 0-55 ПРИ ВИКОРИСТАННІ МОДИФІКОВАНИХ ЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ

Гордієнко О. І., Постосенко В. О., Кравецький Л. Й., Салганська О. О.

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

Метод сублімаційного зневоднення широко використовують для одержання сухих форм штамів мікроорганізмів. Процес ліофільного висушування є останнім етапом в технологічному ланцюгу одержання сухих біологічних об'єктів і є вирішальним у системі управління якістю продукту [1].

Нами раніше було розроблено підхід до оптимізації параметрів етапу досушування при ліофільному висушуванні *E.coli* 0-55 з використанням методів планування повного факторного експерименту [1].

Збереження життєздатності і інших біологічних властивостей бактерій в процесі ліофілізації, крім вдало підібраних параметрів висушування, залежить й від інших факторів: фізіологічного стану культури, захисного середовища, тощо [2, 3].

Метою даного дослідження є розробка комплексного підходу на основі оптимізації параметрів стадії досушування процесу ліофілізації штаму *E.coli* 0-55, відтворення його фізіологічних та морфологічних властивостей культури через пасажування на тваринах та підбору ефективного захисного середовища.

Матеріали і методи. При висушуванні *E.coli* 0-55 використовували сублімаційну установку фірми «Telstar LP3», яка характеризується наступними основними характеристиками: глибоким вакуумом 0,17 мВ, температурою конденсора -45-50 °С. В якості компонентів захисного середовища висушування використовували сахарозу і желатин з кінцевою концентрацією 10 % та 1 % відповідно, та модифіковане сахарозо – желатинове середовище з додаванням аеросилу А-300 з кінцевою концентрацією 0,3 %. Співвідношення біологічної складової до захисного середовища складало 1:1 за об'ємом [1].

Постановку повного факторного експерименту (ПФЕ) здійснювали у такій послідовності: планування і реалізація експерименту, на основі якого визначали коефіцієнти регресії рівнянь, які описують досліджуваний процес, виявлення статистичної значущості коефіцієнтів регресії, проведення аналізу рівнянь [4]. Факторами оптимізації стадії досушування слугували наступні: концентрація живих клітин *E.coli* в межах 0,5-1 млн клітин, тривалість та температура стадії досушування (11-23°С).

Результати досліджень. Важливе значення для правильної постановки експериментів, враховуючи їх значну складність і тривалість у часі, має точний вибір вхідних параметрів і діапазону їх варіювання.

Аналіз процесу досушування *E.coli* 0-55 при ліофілізації показав, що, крім трьох вищезгаданих основних вхідних параметрів (концентрації живих клітин, тривалості та температури досушування), на вихідний параметр КҮО може впливати початкова концентрація клітин в суспензії яка подається на сушку.

Тому нами проведені дослідження по відтворенню культурально-морфологічних та фізіологічних ознак *E.coli* 0-55 через пасажування на лабораторних тваринах (білих мишах).

Варіювання факторів вибрані у наступних межах: початкова концентрація живих клітин 0,500±1000 млн/см³, тривалість досушування 8÷12 годин, температура досушування 11-23 °С. Багатофакторний експеримент здійснювали за допомогою матриці планування з використанням кожного з досліджуваних факторів (концентрація живих клітин (Z_1), тривалість досушування (Z_2) та температура досушування (Z_3) за співвідношенням:

$$X_j = \frac{Z_j - Z_j^o}{\Delta Z_j}, \quad (1)$$

де X_j – кодове значення фактора (безрозмірна величина); Z_j – натуральне значення фактора; Z_j^o – натуральне значення фактора на нульовому рівні; ΔZ_j – натуральне значення інтервалу варіації.

Центр плану з координатами (Z_1^o, Z_2^o, Z_3^o) визначили за виразом:

$$X_j^o = \frac{Z_j^{\max} + Z_j^{\min}}{2}; \quad J = 1,2,3 \quad (2)$$

де Z_j^{\max} і Z_j^{\min} – відповідно максимальне і мінімальне значення конкретного фактора.

Інтервал варіації ΔZ_j знаходили із співвідношення: