

## THE COMPARATIVE STUDY OF ACTIVITY TUBERCULINS

Zavgorodniy A.I., Stegnyy B.T., Bilushko V.V.

National scientific center "Institute of experimental and clinical veterinary medicine", Kharkov

*Purpose* - to conduct comparative studies in terms of biological activity of commercial batches from different manufacturers tuberculin PPD-mammalian international and national standard samples.

*Materials and methods.* To study the biological activity of a comparative study of samples of commercial batches of purified tuberculin (PPD) for mammals produced GF "Sums biofactory" FGUF "biofactory Kursk" international standard sample NIBSCE (United Kingdom) and National standard national sample dried purified tuberculin PPD-mammalian.

The experiment was carried out on 10 clinically healthy bullock 10-12 months of age, body weight 230-280 kg.

Activity series tuberculin different manufacturers were studied in 3 dilutions: 200, 1000 and 5000 IU. Allergens were injected intradermally in depilovani skin in the middle third of the neck using injector "BI-7" at doses of 200, 1000 and 5000 IU in a volume of 0.1 cm<sup>3</sup>. Accounting allergic reactions in animals was performed 72 hours after administration of allergens.

*Results.* Of average size in vnutrishoshkirnyh allergic reactions in cattle to enter tuberculin in a dose-dependent administration of gradually increasing the minimum (4,1±0,37) mm - the introduction of tuberculin in a dose of 200 IU to a maximum of (22,2±2,01) mm - 5,000 IU. The obtained results naturally reflect a gradual increase in the intensity of allergic reactions, depending on the increase in the dose of tuberculin. For example, after the introduction of tuberculin series number 24 (Sums biofactory) at a dose of 200 IU noted potovshennya folds of skin in animals on average (4,1±0,4) mm; 1,000 IU - (6,2±0,60) mm and 5000 IU - (18,0±1,65) mm. Thus, the total intensity of allergic reactions after administration of the drug at doses of 200 and 500 IU was less on research series number 24 than control NIBSE.

*Conclusion.* The research found that PPD-tuberculin mammals of SE "Sums biofactory" FSUE "Kursk biofactory", NIBSCE and national standards for mammalian tuberculin (Ukraine) for biological activity are equivalent diagnostic agents for in vivo diagnosis of tuberculosis in allergic animals.

*Prospects for future research* are to develop national standard samples of purified allergen dry with atypical mycobacteria (AAM), which would be responsible for diagnostic as the national standard for mammalian tuberculin when used in simultaneous allergy test to determine the nature of allergic reactions to tuberculin in cattle.

**Keywords:** tuberculin (PPD) for mammals, biological activity, allergic reactions, international units, cattle.

УДК 636.09:619:616.988.27

## ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ТА СПЕЦИФІЧНОСТІ ДІАГНОСТИЧНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ПЛР ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ГЕНОМУ ВІРУСУ ЧУМИ М'ЯСОЇДНИХ

Кацимон В.В., Карпуленко М.С., Головка О.А.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ, e-mail:vetbiotk@i.ua

У статті відображено результати роботи щодо розроблення чутливої та специфічної тест-системи для ідентифікації геному вірусу чуми м'ясоїдних. Послідовно описано методи отримання специфічних праймерів, режими постановки зворотно-транскриптазної полімеразної реакції та результати дослідження чутливості специфічності розробленої діагностичної тест-системи.

**Ключові слова:** геном вірусу, діагностика, тест-система, чума м'ясоїдних

Чума собак – поширене в усьому світі висококонтагіозне, гарячкове, системне захворювання, викликане інфекційним вірусом чуми собак (canine distemper virus, CDV). Широкий спектр ураження вірусу охоплює не тільки собак, але й інших хижаків. Вірус чуми собак належить до роду *Morbillivirus* підродини *Paramyxovirinae* сімейства *Paramyxoviridae*. Сімейство *Paramyxoviridae* разом з родинами *Bornaviridae*, *Filoviridae* і *Rhabdoviridae* належить до порядку *Mononegavirales*. До сімейства *Paramyxoviridae* по Принглу [1] належать обидві підродини *Paramyxoviridae* (з родами *Morbillivirus*, *Paramyxovirus*, *Rubulavirus*) і *Pneumovirinae* (з родом *Pneumovirus*) [2].

До Морбіллівірусів відноситься крім вірусу чуми собак також: патогенний для людини вірус кору (measles virus MV), вірус чуми великої рогатої худоби (RPV), збудник чуми дрібної рогатої худоби (Pestides-petits – ruminants Virus, PPRV), також Мобіллівіруси морських ссавців (вірус чуми тюленів «phocine distemper virus», PDV); «porpoise morbillivirus», PMV і морбіллівірус дельфінів DMV [3].

Незважаючи на великі успіхи в боротьбі з чумою м'ясоїдних, пов'язані з впровадженням засобів специфічної та симптоматичної терапії, поліпшенням контролю за носіями і переносниками збудника в природних вогнищах, немає впевненості в тому, що епізоотії чуми м'ясоїдних не повторюватимуться. Проблеми специфічної профілактики та своєчасної діагностики, саме тому як і раніше актуальні, проте для повного вирішення їх ще далеко. Як і раніше [4], немає єдиної думки про переваги тих чи інших вакцин, методах обліку ефективності щеплень, показаних до них і навіть про способи проведення імунізації. Також гостро стоїть і проблема діагностики [5]. Не всі методи сучасної діагностики можуть служити в якості чутливої та специфічної системи для виявлення інфекції вірусу чуми собак у живих тварин. Одними з найбільш високочутливих лабораторних методів діагностики інфекційних хвороб, у тому числі і полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР).

ПЛР базується на визначенні у досліджуваному матеріалі специфічних для даного збудника нуклеотидних послідовностей його геному [6, 7].

**Мета роботи:** розробити діагностичну тест-систему ПЛР для ідентифікації геному вірусу чуми м'ясоїдних в біологічному матеріалі різного походження.

**Матеріали та методи.** При розробці специфічних праймерів для виявлення вірусу *Canine Distemper Virus* (CDV) на основі ПЛР використовували бази даних GenBank, EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека), DDBJ (Японська база даних нуклеотидних послідовностей), PDB sequences.

За літературними даними було визначено декілька маркерних послідовностей: «highly conserved region of the NP gene of the Ond-CDV strain» та «consensus sequence of 55 gene N», що придатні для розробки специфічних праймерів, з яких для подальшої роботи було обрано ділянку «highly conserved region of the NP gene» (GenBank: AJ009656) РНК вірусу CDV.

Потім ми провели пошук нуклеотидних послідовностей «conserved region of the nucleocapsid protein N gene» РНК вірусу CDV для наступного аналізу їх варіабельності, та пошуку консервативних ділянок, необхідних для визначення праймерів. Використовуючи комп'ютерну програму "Vector NTI" та "PerlPrimer" було розроблено декілька пар праймерів, з яких було обрано одну пару CDV F5 (прямий праймер) та CDV R6 (зворотний праймер) і за допомогою Інтернету (програма BLAST) перевірено їх специфічність. Критичної гомології з нуклеотидними послідовностями інших груп бактерій, вірусів або еукариот виявлено не було.

ПЛР проводили на чотирьох каналному ампліфікаторі «Терцик» виробництва НВФ «ДНК-технології» (Росія, м. Москва). Реакційна суміш 25 мкл вміщувала: 67 ммоль трис-НСІ (рН 8,8), 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,0 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 0.01 % твін-20, по 100 мкмоль дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, 50 пмоль кожного із специфічних праймерів, 2 од. Таq-полімерази, 5 мкл зразків виділеної кДНК. Для попередження випаровування у кожний зразок поверх реакційної суміші нашаровували по 30 мкл мінеральної олії. Ампліфікація складалась з 35 циклів. Кожний цикл ампліфікації включав денатурацію кДНК за температури 95 °С – 45 секунд, відпал праймерів за температури 58 °С – 30 секунд, синтез комплементарних ланцюгів за температури 74 °С – 40 секунд (в останньому циклі цю стадію було подовжено до 5 хвилин). Детекцію продуктів реакції проводили за допомогою електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі (забарвленому бромідом етидію) з використанням трис-боратного буфера при градієнті напруги 10 В/см. Результати оцінювали при перегляді гелю після електрофорезу на транслюмінаторі під УФ-світлом по наявності (чи відсутності) червоно-помаранчевих фрагментів нуклеїнової кислоти певного розміру. Специфічність ампліфікованого фрагмента нуклеїнової кислоти визначали його положенням (розміром) по відношенню до фрагментів стандартних маркерів.

**Результати досліджень.** Ключовим етапом у створенні високоспецифічного метода ПЛР-діагностики для виявлення вірусу *Canine Distemper Virus* (CDV) (як і при створенні інших систем ПЛР-діагностики) є вибір послідовностей для олігонуклеотидних праймерів. Цей етап базується на попередньому вивченні літературних джерел, даних Інтернету і подальшій безпосередній розробці пари олігонуклеотидних праймерів за допомогою спеціальних комп'ютерних програм. Пара олігонуклеотидів повинна відповідати певним вимогам ([http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html)):

- мати високу специфічність для зв'язування зі строго визначеними ділянками геному збудника;
- мати схожу температуру відпалу й константу зв'язування з нуклеїновою кислотою при певних умовах ПЛР;
- не створювати жорстких вторинних структур;
- не бути комплементарними один до одного.

Було синтезовано 3 пари олігонуклеотидних праймерів, серед яких (для контролю праймерів власної розробки) статейні – CDV F1 і CDV R2 [8]; CDV F3 і CDV R4 [9] та власної розробки – CDV F5 і CDV R6 (таблиця 1). Синтез праймерів на наше замовлення виконано у НВФ «Літех» (Російська Федерація, м. Москва).

Таблиця 1 – Синтезовані пари олігонуклеотидних праймерів

№ пп	Назва	Послідовність (5' → 3')	Р-р фрагменту, н.з.	Маркерна послідовність
1	CDV F1	ACAGGATTGCTGAGGACCTAT	287	highly conserved region of the NP gene of the Ond-CDV strain
2	CDV R2	CAAGATAACCATGTACGGTGC		
3	CDV F3	TTCTGAGGCAGATGAGTTCTTC	829	conserved segment of CDV N gene (Onderstepoort)
4	CDV R4	CTTGGATGCTATTTCTGACACT		
5	CDV_F5	AGGAGCAAGTTTGGATTCTGAGG	827	nucleocapsid protein N gene
6	CDV_R6	GACACTAGCTGAGCCTCTTCC		

Перевірку праймерів спершу проводили за температури відпалу – 55 °С і 60 °С (рисунок 1). За результатами проведених досліджень встановлено задовільні властивості розробленої пари праймерів – CDV F5 і CDV R6. Робочою температурою відпалу праймерів було обрано 58 °С.

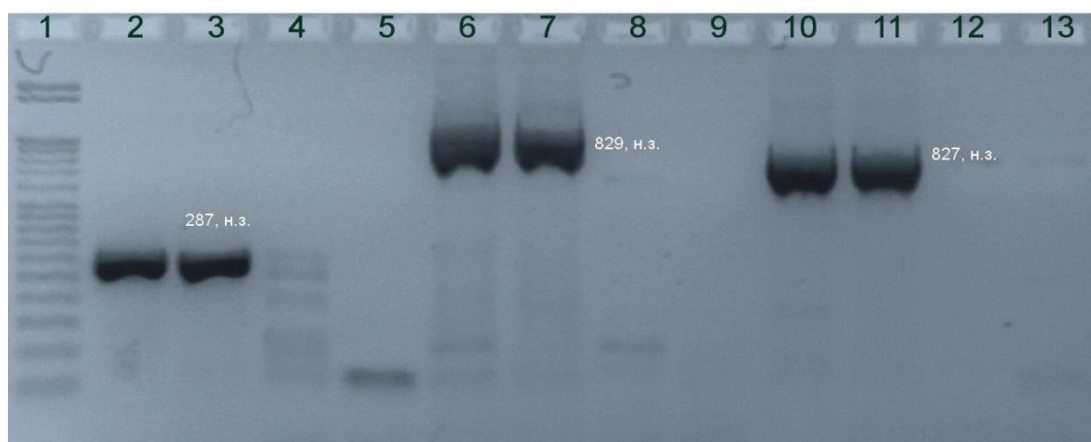


Рис. 1. Електрофореграма результатів ПЛР за різних температур відпалу (н.з. – нуклеотидних залишка) (1 – маркер молекулярної ваги (GeneRuler 50 bp DNA Ladder), 2 – 5 праймери CDV F1 і CDV R2; 6-9 праймери CDV F3 і CDV R4; 10-13 праймери CDV F5 і CDV R6. 2,6,10 – ПКЗ (Tm=55°C, Virus febris contagiosae canis (штам CDVU 39) мин. 10<sup>4.2</sup> TCID<sub>50</sub>); 3,7,11 - ПКЗ (Tm=60°C, Virus febris contagiosae canis (штам CDVU 39) мин. 10<sup>4.2</sup> TCID<sub>50</sub>); 4,8,12 – НКЗ, сироватка крові, Tm=55°C; 5,9,13 – фізрозчин)

Чутливість визначали на розведенні титру Virus febris contagiosae canis (рисунок 2).

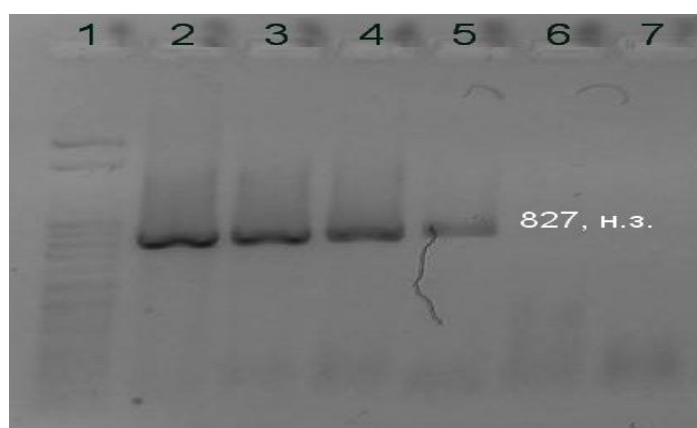


Рис. 2. Електрофореграма результатів ПЛР за визначення чутливості (1 – маркер молекулярної ваги (GeneRuler 50 bp DNA Ladder); 2 – Virus febris contagiosae canis 10<sup>4.7</sup> TCID<sub>50</sub>; 3 – Virus febris contagiosae canis 10<sup>3.7</sup> TCID<sub>50</sub>; 4 - Virus febris contagiosae canis 10<sup>2.7</sup> TCID<sub>50</sub>; 5 - Virus febris contagiosae canis 10<sup>1.7</sup> TCID<sub>50</sub>; 6 – Virus febris contagiosae canis 10<sup>0.7</sup> TCID<sub>50</sub>; 7 – негативний контроль)

Також було перевірено температуру відпалу на патологічному матеріалі (дані не наведені).

Проведена порівняння специфічності розробленої пари праймерів з комерційною ПЛР тест-системою «Полічум» (виробник «Амплісенс», Росія) та серологічною тест-системою «CITO TEST CDV Ag». Результати дослідження наведені в таблиці 2.

**Таблиця 2 – Результати порівняння різних методів виявлення CDV**

№ п/п	Назва вакцинного препарату	Штам у складі препарату	CDV F5 CDV R6	ПОЛІЧУМ	CITO TEST CDV Ag
1	Biocan PUPPY – D	CDVU 39	+	+	+
2	Biocan PUPPY	CDVU 39	+	+	-
3	Biocan DHPPI	(не вказано)	+	+	-
4	Мультикан-4	Штам № 37	+	+	+
5	Мультикан-8	(не вказано)	+	+	+
6	Nobivac Puppy	Onderstepoort	+	+	+
7	Nobivac DHPPI	Onderstepoort	+	+	+
8	Duramune Max 5 CvK\4L	Onderstepoort	+	+	+
9	Vanguard plus 5L	Snyder Hill	+	-	+
10	Розчинник для вакцин «Біо-Тест-Лаб»	НКЗ	-	-	-

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** У результаті виконаної роботи розроблено праймери для детекції чуми м'ясоїдних на основі полімеразної ланцюгової реакції.

Оптимальна температура відпалу складає 58 °С.

Розроблена тест-система володіє високою чутливістю, яка становить  $10^{1.7}$  TCID<sub>50</sub> *Virus febris contagiosae canis*.

Проведено порівняння розробленої тест-системи з ПЛР тест-системою «Полічум» (виробник «Амплісенс», Російська Федерація) і серологічною тест-системою «CITO TEST CDV Ag» за результатами якого вона, принаймні, не поступається комерційним тест-системам.

У даний час проводиться подальша перевірка розробленої тест-системи на патологічному матеріалі, а також розробка нормативної документації з метою реєстрації тест-системи в Україні.

#### Список літератури

1. Pringle, C. R. Virus taxonomy at the Xlth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. - Archives of Virology - Volume 144, Issue 10, - p. 2065-2070. - Print ISSN 0304-8608
2. Інфекційні хвороби тварин / Б.Ф.Бессарабов, С.С.Воронін та ін; Під ред. А.А.Сидорчука. - М.: Колос, 2007. - 671 с. - ISBN 978-5-9532-0301-2.
3. Lamb, R. A., Kolakofsky, D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In Fields Virology, 2001 - pp.1305-1340. Edited by D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins. - DOI 10.1099/vir.0.81715-0
4. Мейер Д. Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпритация и диагностика / Д. Мейер, Дж Харви // [перевод с английского]. - М: 2007. - 456 с. - ISBN 5-9668-0016-2
5. Михайлова М.В. Иммуномодулирующие действие интерферонов и иммуноглобулинов на гуморальный и клеточный иммунитет у собак при чуме плотоядных: Дис. канд. вет. наук: 16.00.04. - Трицк. 1999. - 175с. - УДК 619.616.98 578.831.2.
6. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. in: Science. 239.1988, 487—491. - ISSN 0036-8075.
7. PCR protocols / edited by John M.S. Bartlett, David Stirling. -2nd ed. p. cm. - (Methods in molecular biology ; v. 226). Includes bibliographical references and index. Humana Press Inc. - Totowa, New Jersey, 2003. - ISBN 0-89603-642-1.
8. Frisk, A. L., König, M., et al. Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper. Journal of Clinical Microbiology, Nov. 1999. - pp. 3634—3643. - PMID: PMC85712.
9. Wang et al. Differentiation of canine distemper virus isolates in fur animals from various vaccine strains by reverse transcription-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism according to phylogenetic relations in china. - Virology Journal, 2011, 8:85. - DOI: 10.1186/1743-422X-8-85.

### DETERMINE THE SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF THE DIAGNOSTIC TEST SYSTEM FOR PCR IDENTIFICATION OF CANINE DISTEMPER VIRUS GENOME

**Katsimon V.V. Karpulenko M.S., Golovko O.A.**

State Scientific Control Institute of Biotechnology and strains of microorganisms, Kiev

**Objective:** To develop a diagnostic test system for the identification of genomic PCR canine distemper virus in a biological material of different origin.

**Materials and Methods.** Using computer programs were picked specific primers to conserved regions of the genome of canine distemper virus. PCR was performed on a thermocycler channel. Detection of the reaction products was performed using electrophoresis on a 1.5 % agarose gel. Results were evaluated after viewing the gel under UV light on a transilluminator with UV light for the presence or absence of red-orange

nucleic acid fragments of a particular size. The specificity of the amplified fragment was determined by its position relative to a standard marker fragments.

**Results.** Synthesized were 3 pairs of oligonucleotide primers of which article – CDV F1 and CDV R2 [8]; CDV F3 and CDV R4 [9], as well as their own development – CDV F5 і CDV R6. For the results of studies found satisfactory properties developed when the pair of primers the annealing temperature 58 °C. Sensitivity was determined by dilution Virus febris contagiosae canis. Conducted validation developed primer pair in comparison with commercial PCR test system "Polichum" and serological test system «CITO TEST CDV Ag». Primers were sensitive and specific.

**Conclusions.** 1. Primers were developed to detect canine distemper based polymerase chain reaction. 2. Optimal annealing temperature makes 58 °C. 3. A test system has a high sensitivity, component  $10^{1.7}$  TCID<sub>50</sub> Virus febris contagiosae canis. 4. Comparison of the developed test systems with commercial PCR test system and serological LHP system which resulted in it, at least not inferior to commercial.

**Keywords:** virus genome, diagnostics, system test, distemper.

УДК 619:579.843.96:636.4

## ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕПІЗООТИЧНИХ ІЗОЛЯТІВ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIA*

Кольчик О.В., Прохорятова О.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: kolchuk-elena@yandex.ru

У статті наведено результати лабораторних досліджень щодо вивчення біологічних властивостей 3 епізоотичних ізолятів *Actinobacillus pleuropneumonia*. Визначали культуральні та гемолітичні властивості шляхом пересіву на щільні та рідкі поживні середовища з додаванням дріжджового екстракту (в якості НАД – V-фактор росту) та 5 % сироватки великої рогатої худоби. Вивчено біохімічні властивості та визначено мінімальну летальну дозу в дослідях на білих мишах і мурчаках при інтраперитонеальному введенні.

**Ключові слова:** актинобацильозна плевропневмонія, епізоотичні ізоляти, біологічні властивості, культивування бактерій, патогенність ізолятів, біопроба.

У сучасному свинарстві значну питому вагу займають інфекційні захворювання молодняка з переважним ураженням системи дихання. Однією з гострих проблем є респіраторні хвороби вірусно-бактерійної етіології, які широко поширені в багатьох країнах з розвиненим свинарством і завдають відчутного економічного збитку, тим самим гальмують розвиток галузі. Найбільш поширеними в країнах з розвиненим свинарством є репродуктивно-респіраторний синдром свиней, цирковірусна інфекція, ензоотична (мікоплазмозна) пневмонія, гемофільозний полісерозит, актинобацильозна плевропневмонія, пастерельоз, які найчастіше перебігають як змішані інфекції з варіюючим поєднанням патогенів [3, 5].

За спостереженнями науковців встановлено, що в спеціалізованих свинарських господарствах респіраторний симптомокомплекс викликається складною асоціацією збудників. Так, вірус репродуктивно-респіраторного синдрому свиней, окрім репродуктивної системи, вражає органи дихання, персистує в організмі свиней, розмножується в клітинах імунної системи (лімфоцитах і макрофагах), руйнує їх, призводить до імунодефіцитного стану. У таких тварин створюються умови для залучення до інфекційного процесу бактерійних респіраторних патогенів: мікоплазм, гемофільозних та актинобацильозних бактерій, пастерел й інших мікроорганізмів [3,5].

Останнім часом найбільшу стурбованість у сучасному свинарстві викликає проблема актинобацильозної плевропневмонії свиней. Це пов'язано з тим, що існуючі засоби вакцинопрофілактики, виключно імпорتنі, не відповідають за антигенними характеристиками епізоотичним штамам збудників, що циркулюють у господарствах України [2, 3, 5, 6].

Епізоотологічне обстеження, результати клінічних та патологоанатомічних досліджень, які проводили на промислових свинокомплексах, де фіксували випадки гострої респіраторної патології, вказують на контагіозність інфекції. Захворюваність свиней у стаді може досягати від 15 до 70 %, летальність – до 40 % в залежності від форми перебігу хвороби.

Виходячи з вищевикладеного, актуальним являється вивчення біологічних властивостей епізоотичних ізолятів *Actinobacillus pleuropneumonia*, що були виділені від загиблих свиней, з метою подальшого створення засобів специфічної профілактики.

**Метою досліджень** було вивчення біологічних властивостей епізоотичних ізолятів бактерій *Actinobacillus pleuropneumonia*, що були виділені від загиблих свиней.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводили в лабораторії вивчення хвороб свиней ННЦ «ІЕКВМ». Для виділення, культивування та вивчення культуральних, морфологічних властивостей