

УДК: 591.555.3:591.57

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ
У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ В КОНТЕКСТІ
ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМ БІОБЕЗПЕКИ**

Герілович А. П., Стегній Б. Т.

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail:admin@vet.kharkov.ua*

Барановський Д. І.

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків, Україна

Мандигра М. С.

Національна академія аграрних наук, м. Київ, Україна

Лиманська О. Ю., Болотін В. І.

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

Представлена інформація стосовно ролі та місця молекулярно-генетичних тестів у ветеринарній медицині та сільському господарстві. Показана важливість використання ПЛР у здійсненні контролювання генетичних ресурсів. Доведена необхідність застосування різних форматів ПЛР та інших молекулярно-генетичних методів у системі контролю бактерійних захворювань та вірусних інфекцій тварин і птиці. Розглянуто питання науково-методичного супроводу розробки та впровадження молекулярно-генетичних методів діагностики в Україні. Представлено огляд результатів досліджень щодо створення засобів молекулярно-генетичного моніторингу та діагностики, вивчення варіабельності збудників інфекційних захворювань тварин і птиці, проведених у Національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Визначено основні напрями підвищення рівня науково-методичного забезпечення розробки та впровадження молекулярно-генетичних методів діагностики у ветеринарній медицині в Україні.

Ключові слова: ПЛР, біотехнологія, біобезпека, вірусні інфекції

На сьогодні зростання темпів розвитку аграрного виробництва, біопромисловості, транспортних і зовнішніх торгівельних зв'язків у сучасному світі виводить на порядок денний проблеми продовольчої та біологічної безпеки, вирішення яких є неможливим без залучення надійних засобів моніторингу, прогнозування та ранньої діагностики емерджентних та економічно значимих інфекцій, включаючи зооантропоози. Вирішення цих проблем у сучасному світі базується на інтеграції до практики гуманної та ветеринарної медицини таких фундаментальних дисциплін, як генетика та молекулярна біотехнологія.

Продуктами досліджень молекулярно-біологічного спрямування стали численні тести та засоби діагностики інфекційних і паразитарних хвороб тварин і людини, засновані на виявленні, типуванні та картуванні геному їх збудників з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), методів гібридизації зі специфічними зондами, плазмідного та генного картування, а також методів секвенування (визначення нуклеотидної послідовності геномів мікро- та макроорганізмів) і філогенетичного аналізу (визначення походження та спорідненості збудників), які набувають дедалі більшої доступності у світі [1-5].

Найбільший ажітаж сьогодні створюється навколо методів молекулярної діагностики. З-поміж їх числа рутинними вже стали ПЛР у різних модифікаціях, методи гібридизації зі специфічними зондами та навіть метод секвенування набуває дедалі більшої доступності серед ветеринарної спільноти світу.

Нові тести з виявлення та типування патогенів, що пропонуються для застосування у практиці ветеринарної медицини, завжди потребують ретельної систематизації та визначення їх місця в існуючій системі епізоотологічного та епідеміологічного нагляду.

На сьогодні молекулярно-генетичні тести застосовуються у ветеринарній медицині та сільському господарстві для:

- моніторингу та діагностики інфекційних і деяких інвазійних хвороб,
- типування та паспортизації патогенів тварин, вивчення їх еко-географічних особливостей, дрейфу генетичної мінливості та еволюції,
- дослідження молекулярних механізмів імунної відповіді та взаємодії збудника з макроорганізмом,
- контролю якості та безпечності сільськогосподарської продукції, включаючи продукти харчування та корми,
- контролю якості та безпечності генетичних ресурсів тварин,
- контролю циркуляції патогенів у об'єктах довкілля,
- аналізу походження та паспортизації порід продуктивних та непродуктивних тварин тощо [6-8].

Непрямым свідченням ефективності та доцільності застосування молекулярно-генетичних тестів є неуклібно зростаючі обсяги їх впровадження у світі. Лише за останні 10 років вкладення у їх розвиток виросли з 300 млн. доларів США до 3,2 млрд. [EMBO, 2006-2012].

Яке ж місце повинна зайняти сьогодні ПЛР у практиці ветеринарної лабораторної діагностики? Оскільки реакція є методом прямого виявлення збудника, її можна непрямим чином зіставити з методами індикації антигену збудника чи його безпосереднього ізолювання.

Якщо вести мову про порівняння класичних мікробіологічних тестів з ПЛР, остання явним чином поступається культуральному методу. Це, перш за все, пояснюється природою бактерійних патогенів. Останні є прокаріотичними організмами зі складною геномною організацією, що виключає інфекційність їх геномного матеріалу в разі нежиттєздатності збудника. Описана обставина нівелює цінність ПЛР як діагностичного тесту при бактеріальних інфекціях. Єдиним послабленням у цьому є застосування так званого іРНК-скринінгу, що передбачає виявлення життєздатних форм за наявності такого важливого елементу їх репродукції, як інформаційна РНК. «ДНК-копії з її матриць можна детектувати за ПЛР на фоні попереднього руйнування в екстрактах ДНК відповідними ензимами, вільними від РНКаз. Живі форми мікроорганізмів продукують іРНК, а виявлення її є свідченням життєздатності збудника. Цей тест досить давно описаний в літературі, однак унаслідок трудомісткості та довгої тривалості не користується популярністю ні серед дослідників, ані у практиці.

Є сенс охарактеризувати ПЛР як доцільний тест при скринінгових дослідженнях матеріалів, що вміщують ймовірних збудників бактерійної природи в об'єктах довкілля (сибірка, лептоспори за МЕБ, 2008-2015) та об'єктах післязабійної експертизи (бруцельоз, лістеріоз, сальмонельоз, шигатоксигенні кишкові палички за МЕБ, 2008-2015). У випадку дослідження діагностичних матеріалів, чия інфекційність не доведена за класичними методами, позитивний результат є лише приводом для занепокоєння та загострення моніторингових заходів, а не може інтерпретуватись як «діагноз».

У цьому контексті слід віднести до окремої групи об'єктів нагляду генетичні ресурси. Їх контролювання потребує системного підходу. Зокрема, на етапі відбору та перед консервацією сперми, яйцеклітин та ембріонів тварини мають бути досліджені за рекомендованими методами, а продукти можуть бути скринінгово обстежені за допомогою ПЛР з виявлення таких чинників, як бруцели та хламідії, що передаються з цими матеріалами. У разі виявлення ДНК згаданих патогенів ефективність тестувань має бути доведена класичними методами, проте на весь час дослідження згадані матеріали повинні проходити «карантинування», що виключає торгівлю, імпортно-експортні та транспортні операції по відношенню до цих генетичних ресурсів (ОІЕ, 2004, 2008, 2009, 2012, 2014).

Місце ПЛР та інших діагностичних методів молекулярної генетики в системі контролю бактерійних хвороб може бути також визначене, як неодмінна складова в системі ідентифікації та типування патогенів після ізолювання та охарактеризування за мікробіологічними техніками. Серед захворювань, що контролюються МЕБ, така ситуація описана по відношенню до збудників сибірки, хламідій, мікоплазм, лептоспир, мікобактерій, пастерел та інших інфекційних агентів (ОІЕ, 2012, 2014). Окрім того, вона є важливим інструментом для індикації та ідентифікації трудно культивованих або нових захворювань, до яких інші методи виявлення збудника ще не створені.

Інша ситуація існує по відношенню до вірусних інфекцій. Вірусні патогени є носіями генетичного матеріалу, який має інфекційні властивості, що пояснює діагностичну цінність факту детектування геному в біоматеріалах. Це твердження не виключає сприйняття «золотих стандартів» діагностики вірусів тварин, тобто ізолювання в культурах клітин, ембріонах курей та серологічної ідентифікації в реакціях нейтралізації, імунофлуоресценції тощо, але значно розширює повноваження та ефективність групи методів молекулярної діагностики та молекулярної епізоотології.

Сьогодні документально роль ПЛР як тесту, рекомендованого для постановки діагнозу, відведена Міжнародним Епізоотичним Бюро при блютангу, інфекційному ринотрахеїті ВРХ та африканській чумі (виснаженні) коней, а також альтернативним у системі діагностики лейкозу ВРХ (Кодекс МЕБ, 2011). Аналізуючи відношення МЕБ до вірусних інфекцій, що сьогодні контролюються в Україні, ПЛР введено до переліку діагностичних тестів Мануалу майже при всіх хворобах. Виключенням є хвороба Тешена, при якій, згідно цитування того ж Мануалу, ПЛР не має діагностичного значення.

Аналіз існуючих створених та узаконених МЕБ протоколів показує, що місце ПЛР як діагностичного тесту описане при везикулярних хворобах тварин, сказі, блютангу, хворобі Ауескі, високопатогенному грипі, ньюкаслській хворобі, хворобі Гамборо, інфекційному бронхіті курей, інфекційному ларинготрахеїті, інфекційному ринотрахеїті ВРХ, вірусній діареї ВРХ, класичній та африканській чумі свиней, трансмісивному гастроентериті свиней та інших.

При хворобі Ауескі описане застосування ПЛР в якості швидкого та доволі надійного тесту з виявлення вірусоносіїв [9]. Охарактеризовано важливість реакції в системі дослідження матеріалів, що піддалися розкладанню чи бактерійній контамінації, внаслідок чого виключається можливість застосування вірусологічних тестів. Важливою характеристикою ПЛР при скринінгу вірусоносійства є можливість використання її, як дискримінуючого тесту при впровадженні вірусвакцин, що містять марковані штами збудника. Саме така методика розроблена і валідована нами по відношенню до вірусу хвороби Ауескі, що базується на застосуванні специфічних праймерів до гена gE. За чутливістю вказаний тест у кілька десятків разів переважає існуючі методики з виявлення вірусних антигенів та ізолювання збудника.

Блютанг є однією з небагатьох хвороб вірусної етіології, для контролю якої ПЛР є рекомендованим МЕБ тестом. Це стосується в першу чергу тварин і матеріалів тваринного походження, що виступають об'єктами міжнародної торгівлі. У доступній літературі також є відомості про ефективне застосування тесту з метою типування збудника за серотиповою належністю. При цьому більшість вчених визнає пріоритетну роль протоколів на основі класичної ПЛР, віддаючи їм перевагу у порівнянні до ПЛР у реальному часі, саме протоколи для ПЛР у гель-варіанті зведені у Мануалах з діагностичних тестів МЕБ (5-те та 6-те вид.) [10].

Іншим захворюванням, у системі лабораторної діагностики якого ПЛР також займає місце тесту першої групи пріоритету, є інфекційний ринотрахеїт ВРХ. Цінність ПЛР як діагностичного тесту проявляється у здатності до більш ефективного виявлення вірусу за застосування вірусологічних методик, можливість досліджувати непридатні до вірусологічних експертиз матеріали,

що є у наявності у малій кількості, або піддалися розкладанню, при дослідженнях у сфері ветеринарного нагляду, особливо об'єктів міжнародних торговельних взаємовідносин – генетичних ресурсів ВРХ. Крім того, уже за допомогою ПЛР можна провести більш глибокі дослідження з типування збудника. При цьому є діагностичні протоколи, здатні диференціювати лінії вірусу на серотипи (1, 4, 5) та субтипи (1.1, 1.2), надаючи більше можливостей для вираженої та цілеспрямованої організації оздоровчих і превентивних заходів у зоні поширення інфекції [11].

ПЛР надає особливих можливостей в контексті наукових досліджень РНК-вміщуючих вірусів, зокрема таких, як збудники ньюкаслської хвороби, високопатогенного грипу птиці, діареї ВРХ, прикордонної хвороби та класичної чуми свиней, сказу та респіраторно-репродуктивного синдрому свиней [12-14].

Так, при ньюкаслській хворобі птиці ПЛР застосовують з метою моніторингу вірусносійства в дикій орнітофауні, індикації та ідентифікації збудника в матеріалах, що надходять для вірусологічних досліджень, а також ідентифікації виділених ізолятів вірусу. ПЛР при ньюкаслській хворобі застосовують також з метою пато- та генотипування вірусу. Для цього генами таргетної детекції є гени протеїну адгезії (F) та нуклеопротеїну (NP). При цьому засоби молекулярно-генетичних досліджень, такі як секвенування та ПДРФ-аналіз, з успіхом можуть замінити трудомісткі та довготривалі, пов'язані з рядом біологічних ризиків, процедури патотипування за біопробу. Вони ж дозволяють встановити генотипові характеристики, що відіграють основну роль у дослідженні шляхів ймовірного заносу інфекції до популяції чутливих до зараження тварин.

При високопатогенному грипі птиці існує дві системи альтернативної діагностики, що взаємно доповнюють одна одну, – вірусологічні та молекулярно-генетичні тестування. Вірусологічні методики при цьому займають провідне місце, але, водночас, вони трудомісткі та потребують багато часу. На їх основі встановлюється офіційний заключний діагноз. З метою прискорення засобів та інструментів механізму реагування при моніторингу та експрес-діагностиці грипу альтернативу їх складають молекулярно-генетичні методології. Вертикаль молекулярної діагностики грипу формується з трьох послідовних ступенів. На першому етапі іде виявлення збудників типу А. У разі наявності на другому проводиться перевірка ймовірної належності циркулюючого вірусу до високопатогенних субтипів H5 та H7, а за показань – і H9. Проби, позитивні за належністю РНК до цих вірусних груп підлягають ще більш поглибленому дослідженню в напрямках секвенування області сайту нарізання гена гемаглютиніну. Ці тестування надають змогу, по-перше, встановити рівень патогенності вірусу за амінокислотною послідовністю його сайту нарізання, а, по-друге, визначити його походження при порівнянні з іншими штамми й ізолятами вірусу. Невід'ємною складовою при молекулярній діагностиці та моніторингу грипу є його диференційна діагностика від ньюкаслської хвороби, що також може бути забезпечена з використанням ПЛР.

Важко переоцінити значення молекулярної діагностики при цілому спектрі інших вірусних хвороб птиці. Зокрема секвенування є чи не єдиним способом диференціації вакцинних та епізоотичних варіантів вірусів інфекційного бронхіту курей та хвороби Гамборо. ПДРФ-аналіз є основою такої диференціації при інфекційному ларинготрахеїті птиці, ентериті гусей та ряді інших інфекцій [15].

Повертаючись до вірусних інфекцій жуйних, необхідно відзначити важливу роль ПЛР при контролі діареї ВРХ та прикордонної хвороби. Молекулярно-генетичні методи при цих інфекціях виконують роль скринінгових тестів з ідентифікації збудника, а також, зважаючи на значне генетичне розмаїття популяцій вірусів, – з їх генотипування.

Стосовно таких дискусійних і важливих на сьогодні захворювань, як африканська та класична чума свиней, сприйняття молекулярно-генетичних прийомів, розроблених для їх скринінгу, в світі є надто неоднозначним. Зокрема, попри існуючі модифікації методу ПЛР в режимі реального часу для детекції вірусу АЧС, лише одна з них набула легалізації згідно Мануалу МЄБ. До того ж, як нам особисто вдалося пересвідчитись, вона за чутливістю значно поступалася методикам на основі класичної ПЛР. Що стосується класичної чуми свиней, то молекулярна діагностика цього захворювання не обмежується лише засобами детекції вірусу, але й існує потреба у генотипуванні його збудника, що знов таки визначає місце класичної ПЛР як основного тесту.

Роль ПЛР в системі контролю генетичних ресурсів ВРХ наряду з протоколами детекції ДНК хламідій та ДНК і РНК інших вірусів є важливим інструментом в перериванні епізоотичного ланцюга при конгеніальних вірозах ВРХ та хламідіозі.

ПЛР має визначне місце при діагностиці сказу. Цей тест дозволяє ефективно досліджувати будь-які види матеріалів, у т.ч. такі, що піддалися природній ферментації та розкладанню, в яких вірус локалізований позаклітинно, секретах та екскретах, щільних (кістковій та хрящовій) тканинах. ПЛР також є інструментом для накопичення варіабельних ділянок генів збудника сказу з метою їх секвенування і генотипування вірусу.

При респіраторно-репродуктивному синдромі свиней ПЛР як скринінг-тест є малоефективним, тим більше він не підходить для діагностики. Однак не остання роль йому належить при визначенні генотипу циркулюючих вірусів, що дозволяє скоригувати імунопрофілактичні схеми.

Важливим місцем ПЛР у системі контролю хвороб свиней є дослідження при цирковірусній інфекції. Як показали дослідження, проведені за допомогою розробленого нами діагностичного комплексу, відсоток уражених тварин у господарствах нашої держави є досить великим. Це зумовлює необхідність загострення контролю за імпортованими тваринами та їх продукцією, адже вони є джерелом потрапляння та поширення вірусу територією України.

Важливим практичним аспектом застосування молекулярно-генетичних тестів є системи біотехнологічного контролю. Завдяки значній експресності цих методів вони придатні для скринінгу контамінації мікоплазмами та вірусними агентами сировини для виготовлення імунобіологічних препаратів, контролю готової продукції (особливо критичним є контроль живих вакцин для ВРХ щодо контамінації вірусом діареї та вакцин проти хвороб свиней щодо цирковірусної контамінації). При цьому молекулярно-генетичні тестування дозволяють ефективно досліджувати автентичність розплеків виробничих штамів і досліджувати інші їх паспортні характеристики.

Якщо роль інструментів молекулярної діагностики більш-менш нами описана вище, то ми зовсім не торкнулися питання стосовно визнаних у світі її інструментів. На сьогоднішній день стрімко розвивається ринок пропозицій щодо ПЛР у режимі реального часу. Ця тенденція з одного боку оцінюється позитивно, адже розробники декларують високу чутливість і специфічність тестувань, більшу у порівнянні до класичного варіанту експресність та безліч інших переваг.

Проаналізувавши значний масив наукової та дорадчої літератури з цього питання слід розставити декілька акцентів. По-перше, зважаючи на ціну обладнання та собівартість самої реакції можна з впевненістю казати, що традиційна ПЛР ще довго буде мати виграшні позиції у порівнянні до ПЛР у режимі реального часу. По-друге, надійність тесту визначається його наявністю у чинних рекомендаціях МЄБ або ВООЗ. При цьому традиційним тестам немає рівних, адже прямі цитування в Мануалі стосовно ПЛР у режимі реального часу є лише при африканській чумі, грипі птиці та інших нечисленних хворобах. По-третє, можливості, притаманні для ПЛР у реальному часі, рутинній діагностиці, скринінгу та моніторинговій роботі просто непотрібні. Швидкість здебільшого полягає лише у відсутності необхідності ставити електрофорез, а вища чутливість супроводжується підвищеними ризиками контамінації матеріалів. Виключенням при цьому є лише методики Rapid-індикації, що проходять без елонгації. У той же час її можна компенсувати збільшенням циклів, nested-модифікацією або залученням праймерів, що фланкують короткі продукти.

З усіх сфер практичного застосування кількісної ПЛР на увагу заслуговує лише необхідність скринінгу продуктів і кормів щодо вмісту генетично модифікованих компонентів, і то тільки тому, що для цих продуктів встановлені припустимі рівні вмісту означених компонентів і їх похідних. Кількісні характеристики детектованих продуктів мають велике значення у наукових дослідженнях з патогенезу та імуногенезу, які у практиці просто непотрібні.

При наукових дослідженнях генотипові та патотипові характеристики вірусів тварин встановлюються методами ДНК-аналізу, для яких ПЛР є інструментом напрацювання матеріалу для вивчення. За ПЛР напрацьовуються фрагменти для ПДРФ, секвенування та інших тестів.

Світові лідери з виробництва товарів і послуг для потреб лабораторної діагностики у ветеринарній та гуманній медицині (Phizer, IDVet, IDEXX, Invitrogen, Sigma, Eppendorf та ін.) пропонують на сьогодні понад 20 тис. найменувань діагностичних тест-систем та супутніх товарів для молекулярно-генетичних досліджень.

Розробка та впровадження молекулярно-генетичних методів діагностики на сьогодні є пріоритетним вектором для більшості міжнародних програм підтримки наукових грантів у галузях біологічної безпеки, аграрних наук та ветеринарної медицини: Horizon 2020 Євросоюзу, Програми Групи Семи «Глобальне партнерство», Програми спільних біологічних досліджень Держдепартаменту США та Програми зменшення біологічної загрози Міноборони США. Сумарний фонд фінансування за цими програмами складає 3-5 млрд. доларів США на рік.

Застосування молекулярно-генетичних методів у системі ветеринарної лабораторної діагностики розпочалося у кінці 1990-х років. Зокрема, у наукових установах НААН ветеринарного профілю були розроблені перші методики з виявлення ДНК вірусу лейкозу ВРХ (ННЦ «ІЕКВМ», 1997) та РНК вірусу класичної чуми свиней (ІВМ, 2001). У подальшому до цієї роботи долучився Державний науково-контрольний інститут біотехнології (ДНКІБШМ) (2005), Державний НДІ з лабораторної діагностики та ветсанекспертизи (ДНДІЛДВСЕ) (2012) та Українська лабораторія якості продукції АПК НУБіП (2007).

Науково-методичний супровід розробки та впровадження молекулярно-генетичних методів діагностики в Україні у 2011–2015 рр. здійснювався в рамках ПНД НААН 32 «Біологічна безпека та здоров'я тварин» та Галузевої НТП з ветеринарної медицини зусиллями науковців ННЦ «ІЕКВМ», ІВМ НААН, ДНКІБШМ та ДНДІЛДВСЕ. Зазначений напрям також входить в перелік пріоритетних векторів наукових досліджень ПНД НААН 38 «Наукове забезпечення контролю епізоотичного благополуччя тваринництва та систем біологічної і продовольчої безпеки України» (Епізоотичне благополуччя, біологічна та продовольча безпека) та Галузевої науково-технічної програми «Науковий супровід ветеринарного забезпечення тваринництва в контексті реалізації стратегії МЄБ, ВООЗ, ФАО «Єдине здоров'я» на 2016–2020 рр.

З метою організації належного наукового супроводу молекулярно-генетичних досліджень у ННЦ «ІЕКВМ» у 2001 році був створений перший у мережі НААН спеціалізований науковий підрозділ – сектор молекулярної діагностики. У 2007 році він реформований у лабораторію, а у 2014 році – у відділ молекулярної епізоотології та діагностики. На сьогодні підрозділ має атестацію на проведення діагностичних вимірювань ДНДІЛДВСЕ та завершується його акредитація за міжнародним стандартом ISO17025.

Уперше в Україні в ННЦ «ІЕКВМ» була розроблена універсальна методологія конструювання олігонуклеотидних систем для розрахунку та перевірки якості праймерів для діагностики, генотипування та клонування патогенів тварин, яка дозволила вивести молекулярно-генетичні дослідження на принципово новий рівень, що відповідає міжнародному.

Науковцями Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» було розроблено та зареєстровано в Україні 12 молекулярно-генетичних тест-систем на основі ПЛР для діагностики туберкульозу, хламідіозу, грипу птиці та свиней, лейкозу, інфекційного ринотрахеїту, вірусної діареї ВРХ, цирковірусної інфекції свиней, хвороби Ауескі, хвороби Марека, ньюкаслської хвороби, мікоплазмозу свиней. Крім того, було створено та апробовано понад 60 методик з виявлення РНК та ДНК патогенів тварин за допомогою ПЛР (у т.ч. детекції ДНК вірусу африканської чуми свиней, мікоплазм 8-ми видів, 4-х видів бруцел, РНК вірусу блютангу та генетичного матеріалу інших збудників вірусних вороб птиці, свиней, ВРХ), які застосовуються в науковій та науково-інноваційній діяльності Інституту. Також були сконструйовані некомерційні рекомбінантні векторні контролі для детекції за ПЛР генетичного матеріалу вірусів блютангу, хвороби Шмалленберг, африканської чуми свиней, грипу птиці, репродуктивно-респіраторного синдрому свиней. На сьогодні більшість цих розробок адаптована під формат ПЛР у режимі реального часу.

Дослідження щодо створення засобів молекулярно-генетичного моніторингу та діагностики, а також варіабельності збудників грипу птиці та ньюкаслської хвороби увійшли до матеріалів науково-практичної роботи «Розробка системи моніторингу, діагностики, прогнозування та специфічної профілактики високопатогенного грипу птиці в Україні», авторський колектив якої у 2009 році удостоєний Державної премії України в галузі науки і техніки. Встановлено ризики поширення вірусів грипу через популяції дикої птиці та вірусу ньюкаслської хвороби через популяції голубів та інших видів синантропної птиці.

На основі молекулярно-генетичних методів у ННЦ «ІЕКВМ» проведені поглиблені дослідження генотипової варіабельності збудників високопатогенного грипу птиці (H5 та H7), ньюкаслської хвороби, репродуктивно-респіраторного синдрому свиней, цирковірусної інфекції свиней, лейкозу, вірусної діареї ВРХ, туберкульозу, бруцельозу тварин, завдяки чому встановлено спектр циркулюючих генотипів, походження зазначених вірусів і бактерій з країн Центральної Європи та Росії. Описаний принципово новий генотип параміксовірусів птиці (13-й). Проведено поглиблену паспортизацію виробничих та епізоотичних штамів Колекції патогенів ННЦ «ІЕКВМ». Усього охарактеризовано близько 270 штамів вірусів та понад 200 штамів бактерій, у результаті чого їх паспортні дані доповнено молекулярно-генетичними характеристиками. Ці штами використовують для розробки ефективних вітчизняних інноваційних імпортозаміщуючих засобів моніторингу, діагностики та профілактики емерджентних та економічно значимих інфекційних хвороб тварин.

Науковцями ІВМ НААН розроблені методики виявлення генетичного матеріалу вірусів свиней, ДНК патогенних лептоспір (спільно з ННЦ «ІЕКВМ»), збудників бешихи та вірусу інфекційного бронхіту курей за допомогою ПЛР. Вченими ДНКІБШМ розроблено методики виявлення ДНК (РНК) збудників сальмонельозу, репродуктивно-респіраторного синдрому свиней, вірусної діареї ВРХ, сказу, чуми м'ясоїдних. Спільно з науковцями ННЦ «ІЕКВМ» розроблено методику виявлення генетичного матеріалу збудника грипу птиці за інноваційним методом ізотермальної ПЛР.

В ІВМ також проведені дослідження генотипової варіабельності вірусу КЧС, цирковірусів і вірусів хвороби Ауескі. У ДНДІЛДВСЕ здійснено філогенетичний аналіз вірусу сказу (спільно з ДНКІБШМ), африканської чуми свиней. Науковці ДНКІБШМ провели філогенетичний аналіз вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней.

З метою контролю якості та безпечності генетичних ресурсів ВРХ та свиней на замовлення Мінагрополітики України у ННЦ «ІЕКВМ» розроблено рекомендації щодо скринінгу їх мікоплазменної, хламідійної та вірусної контамінації за допомогою ПЛР.

Окрім того, з метою гармонізації систем контролю вітчизняних імунобіологічних препаратів до вимог міжнародних стандартів, розроблено методики контролю мікоплазменної, пести- та цирковірусної контамінації об'єктів біотехнологічного призначення (сировини та готової продукції).

На сьогодні більшість завдань планової тематики Інституту включає напрями з філогенетичних досліджень, вивчення еко-географії та молекулярної епізоотології інфекційних хвороб тварин, розробки засобів молекулярної діагностики. Започатковано молекулярно-біотехнологічний напрям досліджень, що включає розробку засобів захисту тварин із залученням технологій рекомбінантних ДНК. Створено методики вивчення імунної відповіді при інфекційному процесі та на фоні вакцинації за експресією генів цитокінів на основі кількісного ПЛР-аналізу. Молекулярно-генетичні методи дедалі більш широко застосовуються в системі контролю безпечності сільськогосподарської продукції.

Науковцями ННЦ «ІЕКВМ» розроблено ряд нормативних документів та Державних стандартів України, що регламентують використання молекулярно-генетичних методів у системі моніторингу та діагностики інфекційних та інвазійних хвороб тварин, які стосуються вимог до облаштування ПЛР-лабораторій, використання методів ПЛР, секвенування, філогенетичного аналізу, гібридизації *in situ*, прободідготовки (екстракції ДНК та РНК), відбору зразків та інших. Застосування молекулярно-генетичних методів регламентоване у нових редакціях інструкцій щодо контролю лейкозу, туберкульозу, бруцельозу, інфекційного ринотрахеїту, блютангу, вірусної діареї (ННЦ «ІЕКВМ»), КЧС, лептоспірозу (ІВМ НААН), АЧС (ННЦ «ІЕКВМ» та ІВМ НААН), сказу (ДНКІБШМ) та інших.

Низка наукових досліджень з питань еко-географічної характеристики, дослідження дрейфу генетичної мінливості збудників та розробки молекулярно-генетичних методів їх детекції виконувались у ННЦ «ІЕКВМ» завдяки 16 науковим міжнародним проектам (два – спільно з ДНКІБШМ) у співпраці з Науковими центрами та референс-лабораторіями МЕБ, ВООЗ, ФАО та Німеччини, Великобританії, США, Канади, Швеції, Італії, Швейцарії, Іспанії, Словаччини, Польщі, Сербії та інших країн. Зазначене дозволило провести навчання близько 80 наукових співробітників, зміцнити матеріальну базу молекулярно-генетичних досліджень із залученням іноземних інвестицій на суму понад 20 млн. грн.

За результатами проведених досліджень за міжнародними проектами наукові співробітники ННЦ «ІЕКВМ» опублікували близько 20-ти статей у провідних фахових журналах далекого зарубіжжя та взяли участь у понад 60-ти наукових конференціях за кордоном, включаючи конференції Американської та Європейської асоціації з біобезпеки, Американської асоціації мікробіологів, Міжнародної мікробіологічної асоціації, Міжнародної асоціації з тропічних хвороб, Європейської асоціації ветеринарних вірусологів, Конференції з діагностики інфекційних хвороб тварин та інших.

З метою розширення обсягів і поглиблення молекулярно-генетичних досліджень ННЦ «ІЕКВМ» співпрацює з установами НАНУ (Інститут біохімії ім. Палладіна, Інститут молекулярної біології та генетики), НАМНУ (Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Громашевського, ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. Мечнікова»), МОЗ (Український НД протичумний інститут), МОН (ДУ «Центр інноваційних біотехнологій») з проблем молекулярної діагностики та епізоотології грипу, ньюкаслської хвороби, лихоманки Західного Нілу, туберкульозу та лейкозу ВРХ.

Необхідно також зазначити, що з метою покращення рівня молекулярно-генетичних досліджень у системі наукового супроводу ветеринарної медицини у ННЦ «ІЕКВМ» проводиться значна робота з підготовки наукових кадрів з біологічних дисциплін,

у т.ч. відкрито аспірантуру та докторантуру за спеціальностями 03.00.07 – генетика та 03.00.20 – біотехнологія. З 2015 року видається фаховий англомовний науковометричний журнал для біологічних і ветеринарних наук «Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety». Співробітниками Інституту захищено 2 докторські та 8 кандидатських дисертацій за тематикою, що включає молекулярно-генетичні дослідження.

З метою поширення знань щодо застосування молекулярно-генетичних методів у практиці ветеринарної медицини науковцями ННЦ «ІЕКВМ» підготовлено та видано три монографії, одна з яких (Молекулярно-генетичні методи у ветеринарній медицині та біотехнології) отримала гриф МОН, як рекомендована для викладання дисциплін мікробіологія, вірусологія та біотехнологія на факультетах ветеринарної медицини аграрних ВНЗ. З метою пропаганди використання молекулярно-генетичних методів досліджень з-поміж науковців і практиків у галузі ветеринарної медицини ННЦ «ІЕКВМ» організовано 8 семінарів та 3 науково-практичні конференції.

Основні проблеми, що на сьогодні є перепорою для більш широкого впровадження молекулярно-генетичних методів у практику ветеринарної медицини, пов'язані з відсутністю в наукових установах НААН ветеринарного профілю обладнання для секвенування, спейсерного типування, обладнання для синтезу праймерів, відсутністю державного фінансування на матеріали та низький рівень умов біобезпеки й біозахисту, що унеможлиблює роботу з високпатогенними збудниками.

Враховуючи вищезазначене, основними завданнями наукових досліджень для підвищення рівня науково-методичного забезпечення розробки та впровадження молекулярно-генетичних методів діагностики у ветеринарній медицині в Україні є:

1. Створення Референс-центру з розробки та впровадження інноваційних технологій моніторингу та діагностики інфекційних хвороб тварин і Міжвідомчого науково-інноваційного центру з проблем аналітичного аналізу геномів і секвенування з оснащенням його відповідним обладнанням.
2. Розробка Національної програми гармонізації системи лабораторної діагностики інфекційних хвороб тварин до міжнародних стандартів із залученням молекулярно-генетичних методів.
3. Поглиблення та прискорення досліджень з вивчення екогеографії та еволюції збудників емерджентних та економічно значимих інфекційних хвороб тварин з використанням молекулярно-генетичних методів.
4. Розширення співпраці із референс-лабораторіями та центрами зі співробітництва МЕБ, ВООЗ та ФАО у напрямках удосконалення системи моніторингу, діагностики та прогнозування інфекційних хвороб тварин з використанням молекулярно-генетичних методів, виконання досліджень за міжнародними програмами та грантами.
5. Розробка нових і валідація існуючих вітчизняних засобів, заходів і національних стандартів діагностики інфекційних хвороб на основі молекулярно-генетичних методів та технологій.
6. Підвищення стандартів біологічної безпеки до рівнів BSL-2 та -3 у лабораторіях, що застосовують молекулярно-генетичні методи моніторингу та контролю епізоотичної ситуації щодо емерджентних хвороб тварин.
7. Розробка нових редакцій нормативних документів щодо контролювання та профілактики інфекційних хвороб тварин з регламентацією залучення молекулярно-генетичних методів для скринінгу епізоотичної ситуації.

Отже, з огляду на зазначене вище, можна стверджувати, що молекулярно-генетичним тестам, особливо ПЛР, на сьогодні належить неабияка роль у системах моніторингу, лабораторної діагностики, біотехнологічного контролю, однак, як і будь-який метод вона потребує кваліфікованого та обґрунтованого застосування. При цьому необхідно перш за все керуватись діючими вимогами та рекомендаціями Міжнародного Епізоотичного Бюро, а у випадках зооантропонозів – Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я. З огляду на інструментальні можливості, потреби у впровадженні та сенс застосовуваних тестів для України є потреба у широкій імплементації методів молекулярної діагностики, яка при використанні у практичних установах має базуватись на традиційній ПЛР, а для забезпечення належного наукового прогресу відповідні наукові центри та установи мають бути забезпечені за підтримки держави засобами детекції у режимі реального часу та ДНК-аналізу (секвенування).

Список літератури

1. A comprehensive functional map of the hepatitis C virus genome provides a resource for probing viral proteins [Text] / R. Remenyi [et al.] // MBio. – 2014. – Vol. 5, № 5. – P. E01469-14.
2. Next generation sequencing for whole genome analysis and surveillance of influenza A viruses [Text] / J. McGinnis, J. Laplante, M. Shudt, K.S. George // J. Clin. Virol. – 2016. – Vol. 79. – P. 44-50.
3. Relative sensitivity of immunohistochemistry, multiple reaction monitoring mass spectrometry, in situ hybridization and PCR to detect Coxsackievirus B1 in A549 cells [Text] / J.E. Laiho [et al.] // J. Clin. Virol. – 2016. – Vol. 77. – P. 21-28.
4. Whelan, S. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past [Text] / S. Whelan, P. Lid, N. Goldman // Trends in Genetics. – 2001. – Vol. 42. – P. 262-272.
5. Lucchini, V. AFLP: a useful tool for biodiversity conservation and management [Text] / V. Lucchini // Comptes Rendus Biologies. – 2003. – Vol. 326. – P. S43-S48.
6. Молекулярно-генетические маркеры в селекционной работе с разными видами сельскохозяйственных животных [Текст] / М.И. Селионова, Е.А. Гладырь, Т.И. Антоненко, С.С. Бурылова // Вестник АПК Ставрополя. – 2012. - № 2. - С. 30-35.
7. Evaluation of PCR Based Assays for the Improvement of Proportion Estimation of Bacterial and Viral Pathogens in Diarrheal Surveillance [Text] / H. Guan [et al.] // Front.Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 386-391.
8. Глазко, В.И. Введение в ДНК-технологии. – М.: ФГНУ «Росинформаротех», 2001. – 436 с.
9. A multiplex PCR for simultaneous detection of classical swine fever virus, African swine fever virus, highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and pseudorabies in swines [Text] / L. Hu [et al.] // Pol.J.Vet. Sci. – 2015. – Vol.18, № 4. – P. 715-723.
10. Benefits of PCR and decentralization of diagnosis in regional laboratories in the management of Bluetongue in France [Text] / S. Zientara [et al.] // Vet. Ital. – 2015. – Vol. 51, № 4. – P. 393-399.

11. Comparison of diagnostic tests for diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis in natural cases of bovine abortion [Text] / V. Mahajan [et al.] // J. Comp. Pathol. – 2013. – Vol. 149, № 4. – P. 391-401.
12. Biosurveillance of avian influenza and Newcastle disease viruses in the Barda region of Azerbaijan using real time RT-PCR and hemagglutination inhibition [Text] / S. Zeynalova, F. Guliyev, M. Vatani, B. Abbasov // Front. Microbiol. – 2015. – Vol. 6. – P. 1128.
13. Multiplex real-time RT-PCR assay for bovine viral diarrhea virus type 1, type 2 and HoBi-like pestivirus [Text] / V. Mari [et al.] // J. Virol. Methods. – 2016. – Vol. 229. – P. 1-7.
14. Comparison of Automated Quantitative Reverse Transcription-PCR and Direct Fluorescent-Antibody Detection for Routine Rabies Diagnosis in the United States [Text] / M. Dupuis [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2015. – Vol. 53, № 9. – P. 2983-2989.
15. Simultaneous typing of nine avian respiratory pathogens using a novel GeXP analyzer-based multiplex PCR assay [Text] / Z. Xie [et al.] // J. Virol. Methods. – 2014. – Vol. 207. – P. 188-195.

**MOLECULAR-GENETIC METHODS OF RESEARCH IN VETERINARY MEDICINE
AND BIOTECHNOLOGY IN THE CONTEXT OF BIOSAFETY PROBLEM SOLVING**

Gerilovych A. P., Stegnyy B. T.

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

Baranovskyi D. I.

Kharkiv State Veterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

Mandyhra M. S.

National Academy of Agrarian Sciences, Kyiv, Ukraine

Limanskaya O. Yu., Bolotin V. I.

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

The information about the role and place of molecular genetic testing in veterinary medicine and agriculture is presented. The importance of PCR implementation in the genetic resources monitoring is shown. The necessity of PCR and other molecular-genetic methods appliance in the control system of animals and birds bacterial diseases and viral infections is proved. The questions of scientific and methodological support for the development and implementation of molecular genetic diagnostic methods in Ukraine are analyzed. The review of the research findings with regard to create the molecular genetic tools for monitoring and diagnostics providing, studying the variability of infectious diseases of animals and birds, conducted at the National Research Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine» is shown. The main directions of scientific and methodological support of the development and implementation of molecular genetic diagnostic methods in veterinary medicine in Ukraine are determined.

Keywords: PCR, veterinary medicine, viral infections