

BIO-INFORMATIVE DEVELOPMENT OF PRIMERS FOR PIG CIRCOVIRUS OF TYPE II TYPING BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Gerilovych A.P., Rudova N.G.

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

Porcine circoviral infection is widespread in most countries where pig production is developed. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) has several genotypes, determining which sets the origin of the virus. The article describes the results of research on assessment bioinformatics for PCV-2 genome polymorphism and the calculation of oligonucleotides to genotype 2.1, 2.2 and the new genotype 2.3. The theoretical research on the detection of latitude and intraspecific specificity of designed primers has been conducted.

УДК 57.043:578.71

РОЗРОБКА БІОЛОГІЧНО БЕЗПЕЧНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ТА ЗБЕРЕЖЕННЯ ВІРУСІВ І ВІРУСОВМІЩУЮЧОГО МАТЕРІАЛУ

Стегній М.Ю.

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

За вірулентною активністю віруси поділяються на три групи, кожній з яких установлюється визначений порядок обліку, зберігання, відпуску, транспортування та внутрішньо лабораторного поводження [4]. Розробка біологічно безпечних систем зберігання патогенного вірусного біоматеріалу за допомогою сучасних кріотехнологій необхідна для впровадження світових стандартів біобезпеки та біозахисту та запобігання поширенню збудників зоонозів та зооантропонозів [1, 2, 3].

Розробка біологічно безпечних кріотехнологій доставки вилученого інфекційного матеріалу вірусного походження для наступного збереження в умовах кріобанку включає й біологічно безпечну упаковку та ємності для кріоконсервування отриманих біоматеріалів з метою усунення можливості інфікування як дослідника, так і рідкого азоту патогенним матеріалом при розгерметизації упаковки.

Тому актуальною є розробка біологічно безпечних кріотехнологій кріоконсервування та збереження у рідкому азоті вилучених штамів з використанням біобезпечної упаковки вірусного біоматеріалу. Вилучені під час спалахів інфекційних захворювань штамми повинні зберігатись в кріобанку ННЦ «ІЕКВМ» для подальшої роботи з отримання з них вакцин та діагностикумів. У зв'язку з цим нагальною проблемою стала розробка біобезпечних систем зберігання вірусних штамів збудників першої, другої та третьої групи патогенності для запобігання витоку інфекційного біоматеріалу в навколишнє середовище, а також впровадження світових стандартів біобезпеки та біозахисту з метою запобігання поширенню збудників зоонозів та зооантропонозів. Розробка біологічно безпечної технології доставки та наступного збереження в умовах кріобанку вірусного матеріалу обумовлена фізичними властивостями рідкого азоту і, перш за все, його кипінням, навіть, у посудині Д'юара, що приводить до перемішування всіх шарів рідини. Тому у випадку порушення хоча б однієї упаковки з вірусним матеріалом відбувається контамінація усіх поверхонь посудини. Таким чином, основним пунктом, що визначає рівень біологічної безпеки кріоконсервування є надійність герметизації вірусного матеріалу всередині кріоупаковки.

У процесі епізоотологічного моніторингу вірусних захворювань на території України отриманий діагностичний біоматеріал кріоконсервується в польових умовах з послідуною доставкою в лабораторії. Саме тому розробка біологічно безпечних кріотехнологій зберігання патогенного біоматеріалу починається з цього етапу. Під час попередньої роботи нами були розроблені способи кріоконсервування вірусів інфекційного ринотрахеїту та кріоконсервування вірусу хвороби Марека. Отримано дані щодо впливу режимів заморожування на біологічні властивості вірусів. Необхідна розробка біологічно безпечної упаковки та ємностей для кріоконсервування отриманих вірусних біоматеріалів з метою усунення можливості інфікування як дослідника, так і контамінації рідкого азоту патогенним матеріалом при розгерметизації упаковки.

**Мета** цієї роботи – розробити біологічно безпечні технології кріоконсервування, збереження та відтавання вірусних патогенів з наступною розробкою автоматизованої електронної системи контролю вірусних патогенів кріобанку ННЦ «ІЕКВМ».

**Матеріали та методи.** Дослідження проводились на моделі вірусу хвороби Марека, який відноситься до збудників другої групи патогенності [4]. З метою виділення польових ізолятів вірусу хвороби Марека (ВХМ) нами було відібрано вірусоміщуючий матеріал. Матеріал для індикації ВХМ відбирали від птиці з клінічними ознаками ХМ, яку забивали з діагностичною метою, також користувалися патологічним матеріалом від щойно загиблої птиці.

Найбільш придатним матеріалом для вірусологічних досліджень є цільна гепаризована кров, яку відбирали у стерильні пробірки з яремної вени. Для цього птицю фіксували у положенні головою вниз, ножицями зрізували пір'я з латеро-вентральної поверхні шиї, шкіру протирали ватним тампоном, змоченим спиртом, розрізали шкіру стерильними ножицями в каудо-краніальному напрямку. Далі знаходили вену, розрізали її ножицями та збирали кров до пробірки в яку заздалегідь вносили 1-2 краплі гепарину. В одну пробірку набирали не більше 3-5 мл крові, щоб попередити її згортання. При розтині відбирали селезінку, печінку або фабрицієву бурсу.

Для виділення вірусу з епітеліальної тканини пульпи пір'я з трупа птиці висмикували 25-50 махових пір'їн крила чи спини, ножицями зрізували колодочки. Означений патологічний матеріал був розфасований в стерильні кріоконтейнери, що випробували. В якості кріоконтейнерів випробували скляні ампули, поліпропіленові контейнери з кришками, що загвинчуються та силіконовими прокладками, або полістиролові флакони з кришками, що нагвинчуються та полістиролові трубки, що запаюються. Кріоконтейнери занурювали у рідкий азот. Відібраний патологічний матеріал доставляли для дослідження в посудини Д'юара.

Ефективність біобезпеки упаковки, що використовували при кріоконсервуванні, оцінювали згідно дотримання вимог щодо біобезпеки упаковки, а саме: зведення до мінімуму людського фактору при герметизації, надійності, зносостійкості та кратності використання.

**Результати досліджень.** Розробка біологічно безпечної технології упаковки, доставки та наступного збереження в умовах кріобанків вірусного матеріалу передбачає вимоги, які пред'являються до ємностей для кріоконсервування, а саме: забезпечення належної герметичності протягом усіх маніпуляцій при кріоконсервуванні, біологічна інертність, висока теплопровідність. Однак на практиці виконання вищезазначених вимог ускладнювалося повним або частковим руйнуванням матеріалу упаковки, надтекучістю рідкого азоту, який проникає навіть в мікротріщини, та людським фактором. Тому ми розробили метод подвійної, або багат шарової герметизації вірусного матеріалу при його доставці та зберіганні у рідкому азоті в умовах кріобанку. Для цього використовували

захисні кріотрубки, полістиролові трубки та поліетиленові пакети як другий шар навколо первинного кріоконтейнера перед процедурою занурення вірусного матеріалу у рідкий азот.

Проведено дослідження з розробки біобезпечних умов і режимів відтавання патогенного матеріалу та використання в якості теплоносія дезінфікуючих розчинів, оскільки при відтаванні ємностей з кріоконсервованим патогенним матеріалом у випадку влучення в них рідкого азоту можливі вибухи з утворенням аерозолі. В якості найбільш підходящого дезінфікуючого засобу для цього виявився 6 % перекис водню.

Дослідження проводились на моделі вірусу хвороби Марека, який відноситься до збудників другої групи патогенності. В якості кріоконтейнерів для цільної гепаризованої крові, яку відбирали у стерильні скляні пробірки з яремної вени хворої птиці були випробувані скляні пробірки та поліпропіленові кріопробірки з кришками, що загвинчуються та силіконовими прокладками; для шматочків органів (селезінки, печінки, бурси фабрицієвої, очини пір'я) – поліетиленові пакети та поліпропіленові кріопробірки, для вірусемісного клітинного матеріалу – поліпропіленові кріопробірки з кришками, що загвинчуються та силіконовими прокладками. Крім того для вірусемісного клітинного матеріалу використовували металеві контейнери із нержавіючої сталі.

При доставці переліченого діагностичного матеріалу в поліетиленових пакетах для підтвердження діагнозу за «золотим стандартом» (вірусологічний метод) жодного разу не вдалося виділити ВХМ на культури клітин за причини мікробної контамінації діагностичного матеріалу навіть у випадках використання подвійних доз антибіотиків. Тому в якості первинної упаковки для діагностичного матеріалу в подальшому використовували стерильні скляні пробірки багаторазового використання та одноразові поліпропіленові кріопробірки з кришками, що загвинчуються та силіконовими прокладками. Розроблена біологічно безпечна та економічно вигідна технологія упакування, доставки та наступного збереження в умовах кріобанку вірусного матеріалу включає використання базового принципу потрібної упаковки інфекційного діагностичного матеріалу. При цьому первинна герметична упаковка в оптимальній кількості до трьох первинних контейнерів, що поміщені в поліетилен, занурюється в сорбент на основі природного алюмосилікату вермикуліту – «Сорбовер» (ТУ У 46.15.411-99). Кількість сорбенту повинна бути достатньою для поглинання інфекційного агенту. Сорбент в свою чергу також поміщений в поліетиленовий мішечок, який занурюється у посудину Д'юара з рідким азотом.

За результатами проведених досліджень з метою підвищення якості діагностики ХМ вважаємо за потрібне внести зміни та доповнення до Інструкції про заходи з профілактики та ліквідації хвороби Марека у курей за №919/6108 від 30 жовтня 2001 р. щодо біологічно безпечної технології упакування, доставки та наступного збереження діагностичного матеріалу з використанням базового принципу потрібної упаковки інфекційного діагностичного матеріалу для підтвердження діагнозу на ХМ.

**Висновки.** 1. Розроблена технологія біологічно безпечного збереження вірусів та вірусемісного матеріалу в умовах кріобанку що являє собою економічну багатозарову упаковку кріоконтейнерів в поліетилен з наступним зануренням в адсорбуючий матеріал та знов у поліетилен. В якості сорбенту використано препарат на основі природного алюмосилікату вермикуліту – «Сорбовер» (ТУ У 46.15.411-99).

2. Таким чином за результатами проведених досліджень удосконалено біологічно безпечні технології упакування, доставки, збереження інфекційного матеріалу вірусного походження в умовах кріобанку. У подальшому розробка автоматизованої електронної системи контролю вірусних патогенів кріобанку ННЦ «ІЕКВМ»; що дозволить впровадити світові стандарти біобезпеки і біозахисту та знизити ризик поширення збудників зоонозів та зооантропонозів в Україні.

#### Список літератури

1. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях/Третье изд. ВОЗ, Женева, – 2004. – С.1-104.
2. Biosafety, Biosecurity and prevention of Disease [el.source]/2006. – title from the screen [http://www.oie.int/eng/edito/en\_edito\_june03.htm].
3. Building Global Biosafety and Biosecurity: The Importance of Staying Ahead of the Research Curve/James M Welch. 14<sup>th</sup> Annual Conference of the European Biosafety Association. – 13-15April 2011. – Estoril/Portugal. – P. 67.
4. Virus Taxonomy. The classification and Nomenclature of viruses: The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses/ M.H.V.van Regenmortel et al. SanDiego. Academic Press, – 2000. – 1167 p.

## DEVELOPMENT OF BIOLOGICALLY SAFE TECHNOLOGY OF CRYOPRESERVATION AND STORAGE OF VIRUSES AND VIRUS CONTAINING MATERIAL

Stegniy M. Yu.

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

*The paper highlights the relevance of developing biologically safe cryotechnologies of delivery and storage in cryobanks of infectious material of viral origin. The technology of biologically safe delivery and storage of virus-containing material in cryobanks is a profit-proved multilayer packing of cryocontainers in polyethylene, followed by immersion in adsorbing material and again in polyethylene. Packed in such a way, cryocontainer is immersed in the end in liquid nitrogen or liquid nitrogen vapor.*

*As a sorbent there was used the preparation based on natural aluminosilicates vermiculite.*