

O. Galkin, PhD., M. Myhalchuk, B.Sc.
National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv,
V. Kazmirchuk, Dr.Med.Sc.
O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv,
Gurzhenko Yu., Dr.Med.Sc.
Institute of Urology of NAMS of Ukraine, Kyiv

DEVELOPMENT AND COMPARISON OF DIFFERENT VERSIONS OF ELISA FOR DETECTION OF SPECIFIC IgE-ANTIBODIES

Development and comparative study of different modifications of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of specific IgE-antibodies. Biochemical synthesis of conjugates of antibodies and antigens, ELISA. Results: theoretical rationale for the use of ELISA for the detection of specific IgE-antibodies has been done; development and comparative characteristics of two ELISA modifications for the detection of specific IgE to birch pollen profilin (Bet v 2) and heat shock protein of Chlamydia trachomatis (HSP-60): indirect and IgE-"capture" variants (with and without use of avidin-biotin signal amplification) has been implemented. It is proved that in terms of analysis informative indicators (specificity, sensitivity, reproducibility) indirect ELISA does not provide effective determination of specific IgE-antibodies; it is shown that IgE-"capture" ELISA is characterized by satisfactory analytical performance analysis as with or without avidin-biotin amplification.

Keywords: IgE, antibodies, ELISA, allergens

УДК 578.2

С. Демідов, д-р біол. наук, проф., С. Дерев'янка, канд. біол. наук, ст. наук. співроб.,
Т. Бова, канд. біол. наук, М. Гончар, зав. лаб. ПЛР
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТЕШОВІРУСІВ СВИНЕЙ

*За результатами вірусологічних, генетичних та серологічних досліджень штами ентеровірусів свиней Ч-2372, Б-652, П-642, Д-32, Д-33, Д-34, І-59, Р-501, Г-95, П-142, В-151, та Г-31, виділені на території України, рекласифіковано у відповідності до вимог Міжнародного комітету з таксономії вірусів і віднесено до роду *Teschovirus* виду *Porcine teschovirus*. Встановлено високу видову специфічність оригінальних олігонуклеотидних праймерів для ідентифікації тешовірусів свиней, що відкриває перспективи розробки діагностичних тест-систем на основі молекулярно-генетичних методів.*

Ключові слова: тешовіруси свиней, рекласифікація, праймери, полімеразна ланцюгова реакція.

Вступ. Тешовіруси свиней є етіологічними агентами ряду інфекційних хвороб, які завдають значних економічних збитків свинарській галузі. Однією з найнебезпечніших є ензоотичний енцефаломієліт (хвороба Тешена) свиней. Це контагіозне вірусне захворювання, яке супроводжується негнійним запаленням мозку та його оболонок, паралічами і парезами. Серед інфекційних хвороб свиней вірусної етіології, що реєструються в Україні, частка хвороби Тешена становить 24 % [2].

Збудником хвороби Тешена є вірус 1-го серотипу, який згідно сучасної міжнародної класифікації належить до родини *Picornaviridae*, роду *Teschovirus*, виду *Porcine teschovirus* [14].

Найчутливіші до тешовірусів є поросята у 2-6 – місячному віці, рідше свині 7-10 – місячного віку. Клінічні ознаки хвороби у тварин старшого віку реєструються в поодиноких випадках. Залежно від тривалості епізоотичного процесу захворюваність свиней нервовою формою становить 14 – 90 %, а летальність – від 75 до 90 % [6, 8].

Ефективність боротьби з хворобою Тешена, насамперед, залежить від своєчасного проведення протиепізоотичних заходів і, зокрема, постановки діагнозу. Діагноз ставиться на основі клініко-епізоотологічного обстеження свинопоголів'я, результатів патолого-анатомічних та лабораторних досліджень. Лабораторна діагностика включає ізоляцію вірусу в культурі клітин з наступним типуванням його в реакції нейтралізації вірусу (РН) або імунофлюоресценції та виявлення вірусспецифічних антитіл у сироватках крові тварин. Для цього в Інституті сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН розроблено набір діагностиків ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней в реакції нейтралізації вірусу [6]. Цей метод і на сьогоднішній день є еталоном і основним тестом, однак він довготривалий, трудомісткий, потребує використання культури клітин, дорогих живильних середовищ. Крім того, постійно існує небезпека контамінації культури клітин мікрофлорою. У результаті тривалість постановки діагнозу збільшується з 10-ти до 30 діб.

Останні досягнення молекулярної біології відкривають перспективи розробки діагностичних засобів для ідентифікації вірусів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). В 1999 р. на основі вивчення структури геному Міжнародний комітет з таксономії вірусів [9-12] рекласифікував ентеровіруси свиней. За рішенням комітету ентеровіруси свиней, які відносились до родини *Picornaviridae* і роду *Enterovirus*, рекласифіковані в межах цієї ж родини в два окремих роди: *Teschovirus* з видом *Porcine teschovirus* (PTV) і власне під *Enterovirus* з видами *Porcine enterovirus A* та *Porcine enterovirus B* (PEV) (табл. 1.). До виду *Porcine teschovirus* віднесено 11 серотипів вірусів, до виду *Porcine enterovirus A* – один серотип, виду *Porcine enterovirus B* – два серотипи [3]. У 2009 році Міжнародний комітет з таксономії вірусів рекласифікував вид *Porcine enterovirus A* в окремий рід *Sapelovirus* вид *Porcine sapelovirus* (PSV) [15].

У зв'язку з рекласифікацією ентеровірусів свиней виникає необхідність у розробці нових високо специфічних методів ідентифікації вірусів, визначення таксономічного положення раніше виділених в Україні епізоотичних, референтних та виробничих штамів ентеровірусів свиней у відповідності до положень Міжнародного комітету з таксономії вірусів.

Метою нашої роботи було дослідження РНК вірусів в полімеразній ланцюговій реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ) за використання нових штучно синтезованих, оригінальних, олігонуклеотидних праймерів та проведення генетичної рекласифікації штамів ентеровірусів свиней, виділених на території України.

Матеріали і методи. В досліді використано штами ентеровірусів свиней (згідно тривіальної класифікації Романенка В.П. [7]) Ч-2372, Б-652, П-642, Д-32, Д-33, Д-34, І-59, Р-501, Г-95, П-142, В-151, та Г-31, виділені від свиней співробітниками лабораторії вірусології і зберігаються в колекції штамів вірусів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

Таблиця 1. Сучасна класифікація тешо-, ентеровірусів свиней

Рід	Вид	Серотип	Еталонні штами вірусів
<i>Teschovirus</i>	<i>Porcine teschovirus</i>	1	Talfan, Teschen 199, Tirol, DS1520/93
		2	T80, O3b
		3	O2b
		4	PS36
		5	F26
		6	PS37
		7	F43
		8	UKG 173/74
		9	VIR 2899/84
		10	VIR 460/88
		11	Dresden
<i>Sapelovirus (Enterovirus)*</i>	<i>Porcine sapelovirus (Porcine enterovirus A)*</i>	8	V13
<i>Enterovirus</i>	<i>Porcine enterovirus B</i>	9	UKG 410/73
		10	LP 54

Примітка: * – переіменовано у 2009 році за рішенням Міжнародного комітету з таксономії вірусів.

Для контролю використовували еталонні штами тешовірусів свиней 11-ти серотипів, ідентифіковані за сучасною міжнародною класифікацією [10]: Teschen 199, O 3b, O 2b, PS 36, F 26, PS 37, F 43, UKG 173/74, VIR 2899/84, VIR 460/88, Dresden та штам сапеловірусів свиней V 13, штами ентеровірусів свиней групи В UKG 410/73 та LP 54, які були люб'язно надані професором Мальте Даубером (Інститут вірусної діагностики ім. Ф. Леффлера Федерального центру вірусних хвороб тварин, Німеччина). Гіперімунні кролячі сироватки крові до цих еталонних штамів, отримували за модифікованою нами схемою [5].

Для контролю специфічності полімеразної ланцюгової реакції використовували вірусомісні суспензії вірусу парагрипу-3 штам ЗКСМ, вірусу класичної чуми свиней штам К, вірусу діареї великої рогатої худоби штам ВК-1, вірусу трансмісивного гастроентериту свиней штам ВС-1, суспензії тканин та органів свині (головного та спинного мозку, легень, селезінки), культури клітин.

У дослідах використовували перещеплювані лінії культур клітин нирки ембріону свині (СНЕВ) та нирки новонародженого сірійського хом'яка (ВНК-21). Усі штами пройшли адаптацію до культури клітин СНЕВ та ВНК-21 шляхом трьох послідовних пасажів.

З метою визначення біологічної активності вірусу *in vitro* готували 10-кратні розведення вірусомісної культуральної суспензії на фізіологічному розчині або на розчині Хенкса. Моношар культури клітин СНЕВ або ВНК-21 відмивали розчином Хенкса, вносили по 0,1 см³ кожного розведення вірусу в 4 пробірки і додавали 0,9 см³ підтримуючого середовища. Пробірки інкубували при температурі 37 °С. Облік результатів цитопатичної дії (ЦПД) вірусів у культурах клітин проводили на 4-7 добу. Титр вірусів вираховували за методом Ріда Л. і Менч Х. [14] і виражали кількістю тканинних цитопатичних доз (ТЦД) в одному см³. За титр вірусу приймали його найбільше розведення (в логарифмах), яке викликало дегенерацію моношару культури клітин в 50 % пробірок. Статистичну обробку результатів проводили за методикою Ашмаріна Н.П. [1].

Типування проводили у реакції нейтралізації вірусу в чутливій культурі клітин з використанням кролячих антисироваток до еталонних штамів тешо-, сапело- та ентеровірусів свиней 14 серотипів. У реакції нейтралізації використовували 100 ТЦД₅₀ виділеного вірусу та 10 нейтралізуючих доз антисироваток. Нейтралізуючі дози сироватки визначали діленням її титру на 10.

Рибонуклеїнову кислоту тешовірусів, сапеловірусів і ентеровірусів свиней виділяли з досліджуваних проб за використання набору "РНК-сорб-В" (Центральний науково-дослідний інститут епідеміології, м. Москва), в основі якого покладено метод сорбції на силікагелі. З виділеної РНК отримували кДНК за допомогою реакції ЗТ. ПЛР проводили на чотирьохканальному ампліфікаторі "Терцик" НВФ "ДНК-Технологія" (Росія, м. Москва). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл вміщувала: 67 ммоль трис-НСІ (рН 8,8), 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 2,0 ммоль MgCl₂, 0,01% твін-20, по 100 мкмоль дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, 2 ммоль (НВФ "ДНК Технологія") кожного з пари специфічних праймерів, 2 од. Taq-полімерази, 5 мкл зразків кДНК.

В реакції використовували наступні пари праймерів [4]:

Sense Primer: **TeschoF51 -5'** –
CCAGCAGCCTCTGTTCAGAAAG
 Antisense Primer: **TeschoR51 -5'** –
GC(A/G)TACTTGTATGAGGCCATC

Для попередження випаровування у кожний зразок поверх реакційної суміші нашаровували по 30 мкл мінеральної олії. Ампліфікацію (помноження) специфічних ділянок кДНК інфекційних агентів проводили за параметрами, представленими в табл. 2.

Детекцію продуктів реакції проводили за допомогою електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі, забарвленому бромідом етидію з використанням трис-боратного буфера (НВФ "ДНК-Технологія") при градієнті напруги 10 В/см. Результати оцінювали при перегляді гелю після електрофорезу на транслюмінаторі під УФ-світлом за наявності (або відсутності) червоно-помаранчевих фрагментів ДНК певного розміру. У результаті отримали продукт ампліфікації розміром 650 нуклеотидних пар. Специфічність ампліфікованого фрагмента ДНК визначали за його розміром відносно фрагментів стандартних маркерів.

Для визначення специфічності сконструйованих праймерів використовували вірусомісні суспензії культур клітин з титром тешо-, сапело- і ентеровірусів свиней 5,0-8,5 lg ТЦД₅₀/см³, вірусомісні суспензії головного та спинного мозку з титром 2,0-5,5 lg ТЦД₅₀/см³, віруси інших таксономічних груп (вірус парагрипу-3, вірус класичної чуми свиней, вірус діареї великої рогатої худоби, вірус трансмісивного гастроентериту свиней), суспензії культури клітин СНЕВ, спинного і головного мозку, селезінки, легень свиней.

Таблиця 2. Температурні і часові параметри ампліфікації специфічної ділянки кДНК

№ циклу	Температура ампліфікації, °С	Час, хв.	Кількість циклів
1	95	5	1
2	94	1	5
	58	1	
	74	1	
	94	0,5	
3	58	0,5	35
	73	0,5	
	72	5	
4			1
5		Зберігання	

Результати та їх обговорення. Досліджувані штамів вірусів проявляли цитопатичну дію в чутливих культурах клітин через 24-48 годин після інокуляції. Інфекційна активність досліджуваних виробничих та лабора-

торних штамів вірусів, виділених на території України, в культурах клітин СНЕВ та ВНК-21 коливалась в межах від 7,0 до 8,5 lg ТЦД₅₀/см³ (табл.3).

Таблиця 3. Інфекційна активність досліджуваних штамів вірусів, виділених на території України

Штам	Призначення штаму	Титр вірусу (-lg ТЦД ₅₀ /см ³)
Ч-2372	контрольний	8,5
П-642	вакцинний	8,0
Б-652	діагностичний	8,0
Г-95	лабораторний	7,5
В-151	лабораторний	7,0
Р-501	діагностичний	7,0
И-59	діагностичний	8,5
Г-31	вакцинний	8,5
Д-32	лабораторний	8,0
П-142	лабораторний	8,0
Д-33	лабораторний	7,5
Д-34	вакцинний, діагностичний	8,0

В реакції нейтралізації штамів вірусів Ч-2372, П-642, Б-652, Г-95, Р-501, И-59, П-142, Д-32, Д-33, Д-34 взаємодіяли з сироваткою крові до штаму Teschen 199 PTV-1, штам вірусу В-151 – з кролячою сироваткою до штаму F

26 PTV-5 (табл. 4). Штам Г-31 нейтралізувався сироватками крові до штамів Teschen 199, VIR 460/88, Dresden PTV-1, PTV-10, PTV-11 відповідно.

Таблиця 4. Результати типування штамів тешовірусів свиней, виділених на території України

Антисироватка Штам	PTV-1	PTV-2	PTV-3	PTV-4	PTV-5	PTV-6	PTV-7	PTV-8	PTV-9	PTV-10	PTV-11	PEV-8	PEV-9	PEV-10
Ч-2372	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
П-642	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Б-652	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Г-95	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
В-151	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Р-501	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
И-59	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Д-32	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
П-142	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Г-31	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–
Д-33	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Д-34	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Таким чином, досліджені штамів вірусів, виділені на території України, за антигенними властивості належать до родини *Picornaviridae*, до роду *Teschovirus*, виду *Porcine teschovirus*, з них 10 – до першого серотипу, 1 – до п'ятого серотипу, 1 – має антигенні зв'язки з еталонними штамми 1, 10, 11 серотипів.

ПЛР проводили з використанням оригінальних штучно синтезованих праймерів. Для визначення специфічності праймерів проведено молекулярно-генетичні дослідження еталонних штамів тешовірусів свиней (табл.5). Встановлено, що праймери фланкують ділянку молекули РНК довжиною 650 нуклеотидних залишків, починаючи з 5271 по 5908 нуклеотид (AF296096) [13].

Це відповідає ділянці геному тешовірусів, яка кодує РНК-залежну РНК-полімеразу. Їх ідентичність для всіх тешовірусів свиней за результатами аналізу банку генів становила 100% (95,5%).

У результаті проведених досліджень РНК штамів вірусів, виділених в Україні, встановлено, що всі вони утворюють продукт ампліфікації довжиною 650 нуклеотидів і за своїми генетичними властивостями належать до роду *Teschovirus* виду *Porcine Teschovirus*. Продукти ампліфікації утворювались як з РНК, виділеною із зразків вірусів накопичених в культурі клітин, так і в суспензіях головного та спинного мозку.

Таблиця 5. Специфічність полімеразної ланцюгової реакції

Зразок	Результат полімеразної ланцюгової реакції
1	2
Позитивний контроль	
Штам Teshen 199 PTV -1	Продукт 650 пар нуклеотидів
Штам 03b PTV -2	Також
Штам -3 02b PTV -3	—
Штам PS36 PTV -4	—
Штам F26 PTV -5	—
Штам PS37 PTV -6	—
Штам F43 PTV -7	—
Штам UKG 173/74 PTV -8	—
Штам VIR 2899/84 PTV -9	—
Штам VIR461/88 PTV -10	—
Штам Dresden PTV -11	—
Досліджувані штами	
Штам Ч-2372 PTV-1	Продукт 650 пар нуклеотидів
Штам П-642 PTV -1	Також
Штам Б-652 PTV -1	—
Штам Г-95 PTV -1	—
Штам В-151 PTV -5	—
Штам Р-501 PTV -1	—
Штам І-59 PTV -1	—
Штам Д-32 PTV -1	—
Штам П-142 PTV -1	—
Штам Г-31 PTV -1, 10, 11	—
Штам Д-33 PTV -1	—
Штам Д-34 PTV -1	—
Суспензія головного мозку Ч-2372 PTV -1	—
Суспензія головного мозку М-2323 PTV -1	—
Суспензія спинного мозку Д-33 PTV -1	—
Негативний контроль	
Штам V13 PSV A-8	—
Штам UKG 410/73 PEV B-9	—
Штам LP54 PEV B-10	—
Вірус парагрипу-3 штаму ЗКСМ	—
Вірус класичної чуми свиней штаму К	—
Вірус діареї великої рогатої худоби штаму ВК-1	—
Вірус трансмісивного гастроентериту свиней штаму ВС-1	—
Головний мозок свині	—
Спинний мозок свині	—
Легені свині	—
Селезінка свині	—
Культура клітин СНЕВ	—

РНК сапеловірусів та ентеровірусів свиней В, вірусу парагрипу, вірусу класичної чуми свиней, вірусу діареї великої рогатої худоби, вірусу трансмісивного гастроентериту продуктів ампліфікації в ЗТ ПЛР із зазначеними праймерами не утворювали. Крім того, зразки культури клітин СНЕВ, органів і тканин свиней у полімеразну ланцюгову реакцію із зазначеними праймерами не всту-

пали, що підтверджує високу специфічність праймерів.

На рис.1 наведена електрофореграма продуктів ампліфікації, де показано результати досліджень 16 зразків, з яких 15 – матеріал, інфікований штамами тешо-, сапело- та ентеровірусів свиней, 1 – суспензія культури клітин СНЕВ. В 12 зразках виявлено РНК тешовірусів свиней.

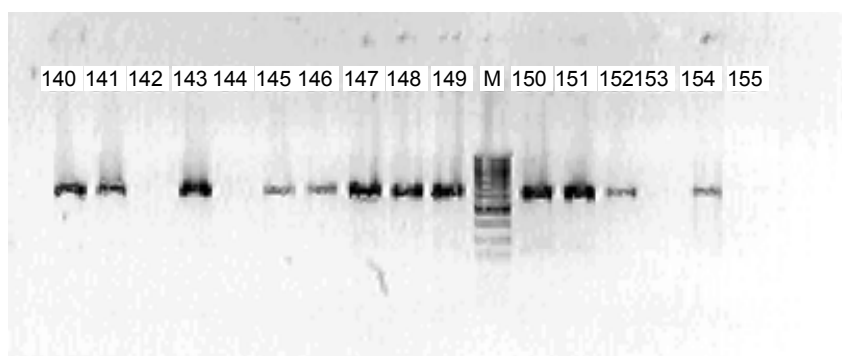


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ЗТ ПЛР:

М – маркери розмірів, пари нуклеотидів;

140, 141, 143, 145-149, 150-153, 154 – штами тешовірусів свиней;

142 – штаму сапеловірусу; 144, 153 – штами ентеровірусу свиней В;

155 – культура клітин СНЕВ.

Отже, встановлено високу специфічність одержаних праймерів, підтверджено їх видоспецифічність. Дослі-

джувані пари праймерів не вступали у взаємодію з РНК вірусів інших таксономічних груп. Продуктів ампліфікації

з культурою клітин СНЕВ та суспензіями органів свиней також не спостерігали.

Висновки. Таким чином, на підставі проведених генетичних досліджень, штами ентеровіруси свиней Ч-2372, Б-652, П-642, Д-32, Д-33, Д-34, І-59, Р-501, Г-95, П-142, В-151, та Г-31, які були виділені на території України, рекласифіковано і віднесено згідно з сучасною міжнародною класифікацією до роду *Teschovirus* виду *Porcine Teschovirus*. Результати дослідження вірусів у реакції нейтралізації та полімеразної ланцюгової реакції збігаються, що відкриває перспективи розробки діагностичних тест-систем на основі молекулярно-генетичних методів за використання розроблених олігонуклеотидних праймерів.

Список використаних джерел

1. Ашмарин Н.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медицинская литература, 1965. – 240 с.
2. Бабкін М.В. Структурний аналіз інфекційних хвороб свиней в Україні в сучасних умовах / Бабкін М.В., Прохорятова О.В., Явніков Н.В., Годовський О.В. // Ветеринарна медицина: Міжвід. тем. наук. зб. – Харків, 2006. – Вип. 86. – С. 25-30.
3. Дерев'янка С.В., Сорока В.І. Класифікація ентеровірусів свиней: сучасний стан та проблеми Ветеринарна медицина. – 2002. – № 80. – С. 195–200.
4. Пат. 51560 Україна, МПК (2009) С12N 15/11. Спосіб виявлення РНК тешовірусів методом зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції / Дерев'янка С.В., Головка А.М., Кацимон В.В., Сорока В.І., Бова Т.О. – № u200913732; заявл. 28.12.2009; опубл. 26.07.2010, бюл. № 14.

5. Пат. 58734 Україна, МПК G01N 33/53 (2006.01). Спосіб одержання гіперімунної сироватки крові до вірусів тварин і рослин / Бова Т.О., Волкова І.В., Дерев'янка С.В. – № u201011151; заявл. 17.09.2010; опубл. 26.04.2011, бюл. № 8.

6. Рекомендації з діагностики, профілактики та ліквідації тешо- та ентеровірусних енцефаломієлітів свиней / [Укладачі В.І. Сорока, А.О. Бокун, С.В. Дерев'янка та ін.]. – Чернівці: Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН, 2006. – 28 с.

7. Романенко В.Ф. Классификация энтеровирусов свиней / Романенко В.Ф., Прусс О.Г., Бабич Н.В. и др. // Вісник аграрної науки. – 1993. – № 1. – С. 94–101.

8. Романенко В.Ф., Сорока В.І. Особенности эпизоотологии энзоотического энцефаломиелита (болезни Тешена) свиней // Общая эпизоотология: иммунологические, экологические и методологические проблемы: 36. наук. праць – Харьков, 1995. – С. 92-95.

9. Agol V.I., Paul A.V., Wimmer E. Paradoxes of the replication of picornaviral genomes // Virus Res. – 1999. – Vol. 62, № 2. – С. 129–147.

10. Fauquet C.M. Viruses Taxonomy: Eighth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses / Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J. et al. – New-York; San Diego: Academic Press, 2005. – P. 657–673.

11. Kaku Y., Sarai A., Murakami Y. Genetic reclassification of porcine enteroviruses // J. Gen. Virol. – 2001. – Vol. 82. – P. 417–424.

12. Kaku Y. Unique characteristics of a picornavirus internal ribosome entry site from the Porcine teschovirus-1 Talfan / Kaku Y., Chard L. S., Inoue T., Belsham G. J. // Journal of Virology. – 2002. – Vol. 76, № 22. – P. 11721–11728.

13. Porcine teschovirus 11 strain Dresden polyprotein gene, complete cds [Електронний ресурс]: Офіційний сайт GenBank. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AF296096>.

14. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimation of fifty per cent endpoints // Am. J. Hyg. – 1938. – Vol. 27, № 3. – P. 493–497.

15. Virus Taxonomy: 2012 Release (current) [Електронний ресурс]: Офіційний сайт Міжнародного комітету з таксономії вірусів. – Режим доступу: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.

Надійшла до редколегії 17.09.13

С. Демидов, д-р биол. наук, проф., С. Дерев'янка, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., Т. Бова, канд. биол. наук, М. Гончар, зав. лаб. ПЛР КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТЕШОВИРУСОВ СВИНЕЙ

По результатам вирусологических, генетических и серологических исследований штаммы энтеровирусов свиней М-2372, Б-652, П-642, Д-32, Д-33, Д-34, И-59, Р-501, Г-95, П-142, В-151, и Г-31, выделенные на территории Украины, рекласифицированы в соответствии с требованиями Международного комитета по таксономии вирусов и отнесены к роду *Teschovirus* вида *Porcine teschovirus*. Установлена высокая видовая специфичность оригинальных олигонуклеотидных праймеров для идентификации тешовирусов свиней открывает перспективы разработки диагностических тест-систем на основе молекулярно-генетических методов.

Ключевые слова: тешовирусы свиней, рекласификация, праймеры, полимеразная цепная реакция.

Demidov S.D.Sc, Derevyanko S.PhD, Bova T.PhD, Gonchar M.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF PIGS TESCHOVIRUS

As a result of virology, genetic and serological tests Porcine enteroviruses strains of Ch-2372, B-652, P-642, D-32, D-33, D-34, I-59, P-501, G-95, P-142, G-31 isolated in Ukraine, reclassified in accordance with the International Committee on Taxonomy of viruses and referred to the genus *Teschovirus* species *Porcine teschovirus*. The high species specificity of the original oligonucleotide primers for identification Porcine teschovirus opens new perspectives of development of diagnostic kits based on molecular genetic methods.

Keywords: Porcine teschovirus, reclassification, primers, polymerase chain reaction.

УДК 577.151.62:571.27:616.36-008.811.1

О. Берник, асп., К. Дворченко, канд. біол. наук,
А. Драницина, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ІМУНОБІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ СТАНУ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА ТРИВАЛОЇ ГІПОХЛОРГІДРІЇ ШЛУНКУ

Робота присвячена дослідженню взаємозв'язку системи оксиду азоту і рівня цитокінів в клітинах печінки щурів в умовах тривалої гіпохлоргідрії. Показано накопичення нітрит-йонів і посилення активності синтази оксиду азоту в клітинах печінки при зниженій шлунковій секреції. В даний час доведена ключова роль оксиду азоту в регуляції імунних реакцій, так, нами встановлено, що тривала гіпохлоргідрія супроводжується виробленням прозапальних цитокінів (фактора некрозу пухлини α , інтерлейкіну-6).

Ключові слова: печінка, гіпохлоргідрія, система оксиду азоту, цитокіни.

Вступ. Гідрохлоридна кислота шлункового соку, яка синтезується парієтальними клітинами фундальних залоз шлунку, виконує важливу роль у регуляції процесів травлення та забезпечує антибактеріальний ефект секрету [1]. Гіпер- та гіпосекреція гідрохлоридної кислоти може спричинювати морфологічні зміни у шлунку, що є причиною розвитку кислото-залежних гастритів. Сьогодні гіпохлоргідрію шлункового соку розгля-

дають як чинник трансформації клітин слизової оболонки шлунку, що може призвести до подальшої малігнізації тканин [2]. Проте, літературні дані щодо молекулярних механізмів цього процесу є малочисельними. Існує ряд механізмів інгібування секреції хлоргідридної кислоти, зокрема, нейрогуморальні та хімічні фактори, проте основним чинником довготривалого зниження секреції гідрохлоридної кислоти є дезактивація