

УДК 57.043;578.71

М.Ю. СТЕГНИЙ<sup>1\*</sup>, А.Н. ГОЛЬЦЕВ<sup>2</sup>, Б.Т. СТЕГНИЙ<sup>3</sup>**Изучение влияния низких температур на сохранность инфекционности, антигенной структуры и ДНК вируса инфекционного ринотрахеита**

UDC 57.043;578.71

M.YU. STEGNIY<sup>1\*</sup>, A.N. GOLTSEV<sup>2</sup>, B.T. STEGNIY<sup>3</sup>**Study of Low Temperature Effect on Preservation of Infectivity, Antigen Structure and DNA of Infectious Rhinotracheitis Virus**

Исследовано влияние замораживания и длительного хранения при умеренно низких температурах и в жидком азоте на сохранность инфекционных свойств, антигенной структуры и ДНК вакцинного и производственного штаммов вируса инфекционного ринотрахеита (ИРТ) крупного рогатого скота. Установлено, что инфекционность в первом пассаже проявляли вирусы, хранившиеся в течение восьми месяцев и полутора лет при умеренно низких температурах, а также в течение двух с половиной лет в жидком азоте. Иммуноферментный анализ показал отсутствие гликопротеина В в размороженных образцах вируса, хранившихся в диапазоне температур от  $-18$  до  $-30^{\circ}\text{C}$ . Специфичность амплифицированного фрагмента ДНК подтверждена методом полимеразной цепной реакции для всех исследованных образцов вируса ИРТ.

**Ключевые слова:** вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, замораживание, низкотемпературное хранение, ПЦР, ИФА.

Досліджено вплив заморожування і тривалого зберігання при помірно низьких температурах і в рідкому азоті на збереженість інфекційних властивостей, антигенної структури і ДНК вакцинного і виробничого штамів вірусу інфекційного ринотрахеїту (ИРТ) великої рогатої худоби. Установлено, що інфекційність у першому пасажі виявляли віруси, що зберігалися протягом восьми місяців і півтора роки при помірно низьких температурах, а також протягом двох з половиною років у рідкому азоті. Імуноферментний аналіз показав відсутність глікопротеїну В у разморожених зразках вірусу, які зберігалися в діапазоні температур від  $-18$  до  $-30^{\circ}\text{C}$ . Специфічність ампліфікованого фрагмента ДНК підтверджена методом полімеразної ланцюгової реакції для всіх досліджених зразків вірусу ИРТ.

**Ключові слова:** вірус інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, заморожування, низькотемпературне зберігання, ПЛР, ІФА.

Effect of freezing and long-term storage at moderately low temperatures and in liquid nitrogen on the integrity of infectious properties, antigen structure and DNA of vaccine and industrial strains of infectious bovine rhinotracheitis (IBRT) was studied. It has been established that infectivity in the first passage was expressed by the viruses stored for 8 months and 18 months under moderately low temperatures as well as for 30 months in liquid nitrogen. Immune enzyme analysis has shown the absence of glycoprotein B in thawed virus samples, stored within the range from  $-18$  to  $-30^{\circ}\text{C}$ . Specificity of amplified DNA fragment is confirmed by PCR for all studied samples of IBRT virus.

**Key-words:** infectious bovine rhinotracheitis virus, freezing, low temperature storage, PCR, IEA.

Вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (ИРТ) является возбудителем высококонтагиозной инфекции, характеризующейся поражением респираторного тракта, конъюнктивитами, вульвовагинитами, абортными, энцефалитами и баланопоститами; относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Alphaherpesvirinae*, виду *Herpesvirus bovis* 1. Геном представлен двуспиральной нефрагментированной линейной ДНК [2].

С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно выявлять низкие концентрации

Virus of infectious bovine rhinotracheitis (IBRT) is highly contagious germ characterizing with the damage of respiratory tract, conjunctivites, vulvovaginites, abortions, encephalitis and balanoposthites; is referred to the *Herpesviridae* family, *Alphaherpesvirinae* subfamily, *Herpesvirus bovis* 1 species. The genome is represented by two-helix non-fragmented DNA [2].

By means of polymerase chain reaction (PCR) it is possible to reveal low concentrations of virus nucleic acid which are not found with dot- or blot-hybridization. For PCR amplification the genes of either thymi-

<sup>1</sup>Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>3</sup>Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН, Г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Пушкинская, 83, г. Харьков, Украина 61002; тел. +38 (057) 707-20-38; факс: +38 (057) 707-10-90; электронная почта: stegniy@vet.kharkov.ua

<sup>1</sup>National Pharmaceutical University, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>3</sup> Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine of Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 83, Pushkinskaya str., Kharkov, Ukraine 61002; tel.: +380 57 707-20-38; факс: +38 (057) 707-10-90; e-mail: stegniy@vet.kharkov.ua

нуклеиновой кислоты вируса, которые не определяются в дот или блот-гибридизации. Для ПЦР амплификации применяют или гены фермента тимидинкиназы, или гликопротеинов gB, gC, gD, gE этого герпес-вируса [6]. Для генотипической дифференциации вакцинного штамма, негативного в отношении гена гликопротеина E и диких штаммов вируса, также была разработана методика постановки ПЦР [7].

Антигены ИРТ выявляют с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА). В полевых условиях диагностические тесты ИФА на гликопротеины gB и gE показывают специфичность до 96% [1], что подтверждает широкий антигенный спектр вируса.

Обычно для ПЦР анализа ДНК-содержащих вирусов применяют одну пару праймеров, комплементарных определенному участку геномной ДНК. В [4] приведены данные о выявлении ДНК вируса ИРТ при помощи ПЦР в образцах, полученных от больных животных, а по данным [3] точность выявления, например вируса иммунодефицита человека, с помощью ПЦР-тестов составляет 98%, в то время как при использовании ИФА – до 99,9%. Сравнительная оценка чувствительности ИФА и ПЦР при идентификации вируса ИРТ также свидетельствует о высокой чувствительности ИФА [6].

Цель исследований – изучение влияния режимов криоконсервирования и хранения производственных и вакцинных штаммов вируса ИРТ на сохранность его инфекционности, антигенной структуры и нуклеиновой кислоты с помощью ИФА и ПЦР, обусловленное необходимостью разработки эффективных способов сохранения эталонных вакцинных и производственных штаммов вирусов, на основе которых производятся современные иммунобиологические препараты для диагностики, лечения и профилактики вирусного ИРТ, отвечающие требованиям Надлежащей производственной практики (GMP).

### Материалы и методы

Исследовали вирус инфекционного ринотрахеита – пустуллезного вальвовагинита крупного рогатого скота: производственный штамм “Молдавский” и вакцинный “Монорин”, предоставленные Институтом экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН. Штаммы хранились при умеренно низких температурах в холодильнике (в диапазоне  $-18...-30^{\circ}\text{C}$ ) и в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Продолжительность хранения составляла 2 года 6 месяцев при  $-196^{\circ}\text{C}$  и от 8 месяцев до 19 лет 7 месяцев – при умеренно низких температурах.

dine kinase enzyme or glycoproteins gB, gC, gD, gE of this herpes virus [6] are applied. For genotype differentiation of vaccine strain negative in respect of glycoprotein E gene and wild strains of virus the formulation method of PCR was designed [7].

IBRT antigens were revealed with solid phase immune enzyme analysis (IEA). In field conditions the IEA specificity to glycoproteins gB and gE makes up to 96% [1] that confirms a wide antigen spectrum of the virus.

Usually for PCR analysis of DNA-containing viruses one pair of primers, which are complimentary to a certain site of genome DNA is applied. In the paper [4] there are presented the data about the revealing of DNA virus of IBRT by means of PCR in the samples obtained from sick animals and according to the data [3] the accuracy of revealing for example human immunodeficiency virus by PCR-tests makes 98% meanwhile as when using IEA it was up to 99.9%.

Comparative study of IEA and PCR sensitivity during identification of IBRT virus corresponds also to a high sensitivity of IEA [6].

The research aim is the studying of the effect of cryopreservation protocols and storage of industrial and vaccine strains of IBRT virus on preserving the infectivity, antigen structure and nucleic acid using IEA and PCR. It was necessary to develop effective ways of preserving reference vaccine and industrial virus strains on the base of those contemporary immune biological formulations for diagnostics, treatment and prophylaxis of IBRT are produced in accordance with GMP requirements.

### Materials and methods

Infectious bovine rhinotracheitis virus: pustulous vulvovaginitis of the cattle, “Moldavsky” industrial strain and “Monorin” vaccine one provided by the Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine of Ukrainian Agricultural Academy of Sciences were under investigation. The strains were stored at moderately low temperatures in a refrigerator (within the range from  $-18$  to  $-30^{\circ}\text{C}$ ) and in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). The storage duration was 30 months at  $-196^{\circ}\text{C}$  and from 8 months to 235 months under moderately low temperatures.

Virus-containing material was derived during virus culturing on inoculated culture of sheep kidney cells in stabilizing medium contained 50% of medium 199, 50% lactal albumin hydrolisate according to the standard methods [6] after a complete destruction of cell monolayer at cytopathic effect (CPE) +++++, then infectious titres of virus suspensions were found and packed into glass flasks for freezing and storage in refrigerator and into 1 and 10 ml stainless steel containers (Special Designing and Technical Bureau with

Вирусосодержащий материал получали культивированием вирусов на перевиваемой культуре клеток почки овцы в поддерживающей среде, состоявшей из 50% среды 199, 50% гидролизата лактальбумина, по стандартной методике [6] после полного разрушения монослоя клеток при цитопатическом действии (ЦПД) +++++, затем определяли инфекционные титры вирусных суспензий и расфасовывали материал в стеклянные флаконы для замораживания и хранения в холодильнике, а в металлические контейнеры из нержавеющей стали (СКТБ и ОП ИПКиК НАН Украины) емкостью 1 и 10 мл – для замораживания и хранения в жидком азоте. В жидком азоте образцы замораживали прямым погружением контейнеров с неочищенным вирусосодержащим материалом со скоростью 300-400°C/мин.

Все образцы размораживали на водяной бане при 39-40°C в течение 1-2 мин. Размороженные образцы вируса, хранившиеся при умеренно низких температурах: штамм “Молдавский” от 30.07.2003 года, время хранения которого составляло 8 месяцев, и его образцы от 11.08.1984 года, продолжительность хранения – 19 лет 7 месяцев, а также штамм “Монорин” от 09.02.1992 г. с продолжительностью хранения 11 лет 6 месяцев и образцы этого штамма от 19.09.2002 г., хранившиеся 1 год 6 месяцев, – пассировали на клеточной культуре MDBK с добавлением 10% лошадиной сыворотки в течение трех суток.

Иммуноферментный анализ и полимеразную цепную реакцию проводили на базе отдела вирусологии Ветеринарного института г. Пулавы (Польша).

Гликопротеин В (gB) вируса ИРТ, хранившегося при умеренно низких температурах, выявляли с помощью ИФА с использованием стандартных диагностических сывороток по методике [6] на микропланшетах. Учет результатов иммуноферментной реакции проводили по показаниям оптической плотности при длине волны 450 нм на считывающем устройстве фирмы Dynex Technologies. Результат реакции считали позитивным, если отношение оптической плотности исследуемого материала и негативного контроля составляло не меньше 2 [5]. Как положительный контроль в ИФА использовали гликопротеин В (gB) нативного вируса ИРТ.

Выявление нуклеиновой кислоты вируса осуществляли методом ПЦР. Размороженные штаммы пассировали в культуре клеток MDBK. При этом наличие цитопатического эффекта свидетельствовало о сохранении инфекционных свойств вируса в процессе длительного его хранения в замороженном состоянии. Экстракцию вирусной ДНК проводили по стандартной методике [6].

Experimental Unit of the IPC&C) for freezing and storage in liquid nitrogen. The samples in liquid nitrogen were frozen by direct plunging of the containers with non-purified virus-containing material with the rate of 300-400°C per minute.

All the samples were thawed on water bath during 1-2 min at 39-40°C. Thawed virus samples stored under moderately low temperatures: “Moldavsky” strain dated of July 30, 2007 the storage time of which made 8 months and its sample of August 11<sup>th</sup>, 1984, and storage duration was 235 months as well as “Monorin” strain of September 1992 with the storage duration of 138 months was passed in MDBK cell culture with adding 10% equine serum for 3 days.

Immune enzyme analysis and polymerase chain reaction were performed at the base of Department of Virology at the Veterinary Institute in Pulawy (Poland).

Glycoprotein B (gB) of IBRT virus stored at moderately low temperatures was revealed using IEA with standard diagnostic sera according to the methods [6] in microtrays. The records of results of immune enzyme reaction were performed on the indices of optical density at 450 nm with the recording device (Dynex Technologies). Reaction result is considered as positive if experimental sample vs. negative control optical density ratio is higher than two. Glycoprotein B (gB) of native IBRT virus was used in IEA as positive control.

The virus nucleic acid was revealed with PCR. Thawed strains were passed in MDBK cell culture. Herewith the presence of cytopathic effect testified to the preservation of infectious properties of the virus during its long-term storage in a frozen state. Extraction of virus DNA was performed on the standard method [6].

At PCR the starters for glycoprotein D (gD) of IBRT virus were used:

D1 5' - GCTGTGGGAAGCGGTACG-3'

D2 5' - GTCGACTATGGCCTTGTTC-3'

PCR products were found with electrophoresis method in polyacryl amide gel. The reactions of restriction fragment length polymorphism (RFLP) such restriction fragments as Hind III, Bgl I, Ava I, Alu I were used.

## Results and discussion

Manifested cytopathic effect on cell culture in the first passage was made by the virus strains stored during 18 months as well as for 8 months within the range from -18 to -30°C. Herewith cytopathic changes were characterized with granulation and rounding of the cells located by groups with their following exfoliation from the glass and degeneration.

Slightly manifested CPE effect represented as the monolayer granulation of MDBK culture with follo-

При ПЦР применяли стартеры для гликопротеида D (gD) вируса ИРТ:

D<sub>1</sub> 5'-GCTGTGGGAAGCGGTACG-3';

D<sub>2</sub> 5'-GTCCGACTATGGCCTTGTGTGC-3'.

Продукты ПЦР обнаруживали методом электрофореза в полиакриламидном геле. В реакции определения полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP) применяли такие ферменты рестрикции, как Hind III, Bgl I, Ava I, Alu I.

### Результаты и обсуждение

Выраженное цитопатическое действие на культуру клеток в первом пассаже оказывали штаммы вируса, хранившиеся полтора года, а также в течение 8 месяцев в диапазоне температур от -18 до -30°C. При этом цитопатические изменения характеризовались зернистостью и округлением клеток, расположенных группами, с последующим их отслоением от стекла и дегенерацией.

Нечетко выраженное ЦПД, проявившееся в зернистости монослоя культуры MDBK с последующей дегенерацией, наблюдали в первом пассаже штамма "Монорин", хранившегося при умеренно низких температурах в течение 11 лет 6 месяцев. В клетках, инфицированных вирусом, хранившимся в течение 19 лет 7 месяцев, ЦПД отсутствовало.

Результаты пассирования штамма "Монорин", размороженного после 2 лет 6 месяцев хранения в жидком азоте, показали выраженное ЦПД в клеточной культуре MDBK. Следовательно, инфекционные свойства штаммов вируса, хранившихся при умеренно низких температурах до полутора лет, и вирусов, хранившихся два с половиной года в жидком азоте, проявляются в виде характерного ЦПД на чувствительную культуру клеток.

Важным условием при работе с вирусами в процессе производства иммунобиологических препаратов является сохранность исходной антигенной структуры вирусного сырья. Поэтому мы изучали сохранность антигенной структуры вируса после замораживания, хранения и отогрева в сравнении с исходной.

Проведенный иммуноферментный анализ показал, что оптическая плотность исследованных образцов не превышала более чем в 2 раза плотности негативного контроля. Это свидетельствует об отсутствии gB у вируса ИРТ после замораживания и хранения. Очевидно, что гликопротеин B при замораживании в указанных режимах не сохраняется в структуре вируса.

Следующим этапом работы было исследование влияния использованных режимов замораживания и хранения на сохранность нуклеотидных последовательностей генома вируса методом ПЦР. Фраг-

ментная дегенерация была observed в первом пассаже штамма "Монорин" хранящегося при умеренно низких температурах в течение 138 месяцев. В клетках, инфицированных вирусом, хранящимся в течение 235 месяцев, ЦПД отсутствовало.

Результаты пассажа штамма "Монорин" после 30 месяцев хранения в жидком азоте показали наличие ЦПД в культуре клеток MDBK. Следовательно, инфекционные свойства штаммов вируса, хранящихся в течение 18 месяцев при умеренно низких температурах и тех, которые хранялись 30 месяцев в жидком азоте, проявляются в виде характерного ЦПД на чувствительную культуру.

Важным условием при работе с вирусами в процессе производства иммунобиологических препаратов является сохранность исходной антигенной структуры вирусного сырья. Поэтому мы изучали сохранность антигенной структуры вируса после замораживания и хранения в сравнении с исходной.

Проведенный иммуноферментный анализ показал, что оптическая плотность исследованных образцов не превышала более чем в 2 раза плотности негативного контроля. Это свидетельствует об отсутствии gB в ИРТ вирусе после замораживания и хранения.

Очевидно, что гликопротеин B при замораживании в указанных режимах не сохраняется в структуре вируса.

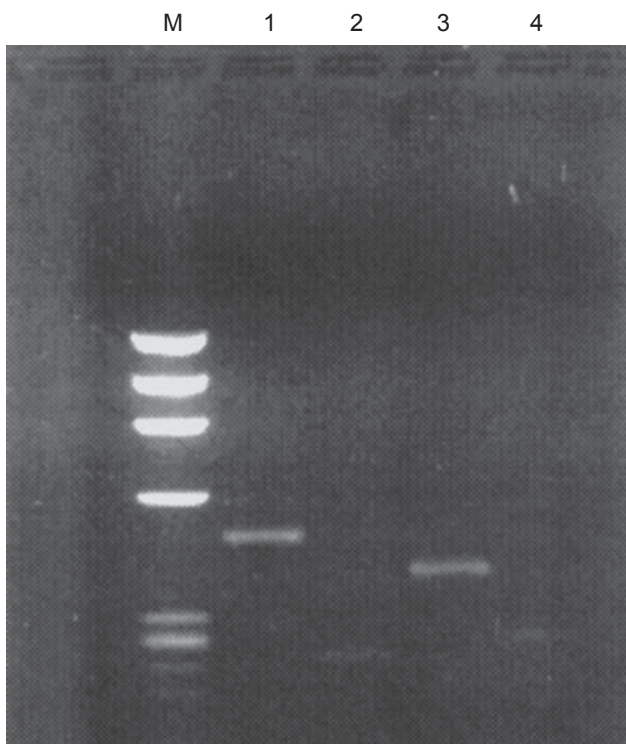
Следующим этапом работы было исследование влияния использованных режимов замораживания и хранения на интенсивность вирусной геномной нуклеотидной последовательности методом ПЦР. D1 и D2 фрагменты генома ИРТ вируса были амплифицированы на матрице вирусной ДНК, полученной из нативных и криопродержанных образцов. В процессе проведения реакции с D1 и D2 праймерами была получена амплификационная продукция размером 466 пар оснований. В образцах штамма "Молдавский" от 11 августа 1984 года амплификационные продукты не были получены.

Специфичность полученной продукции была подтверждена анализом рестрикции с Hind III, Bgl I, Ava I, Alu I рестриктовыми эндонуклеазами для ДНК фрагмента, полученного из штаммов "Монорин" от сентября 19, 2002; "Молдавский" от июля 30, 2003, хранящихся при умеренно низких температурах (Fig. 1).

Амплификационные продукты ДНК фрагмента также были получены для штамма "Монорин" хранящегося при -196°C в течение 30 месяцев. "Cooper" референс-штамм служил в качестве положительного контроля (Fig. 2). В этом случае для гидролиза рестриктового фрагмента использовалась рестриктозная ферментация Hind III. Анализ рестриктового фрагмента подтвердил специфичность полученной ДНК (Fig. 3).

### Выводы

Проведенные исследования показали, что инфекционные свойства, проявляющиеся в виде характерного ЦПД, были observed в вирусах, хранящихся в течение 8 месяцев "Молдавский" и в течение 18 месяцев "Монорин" штаммы в течение



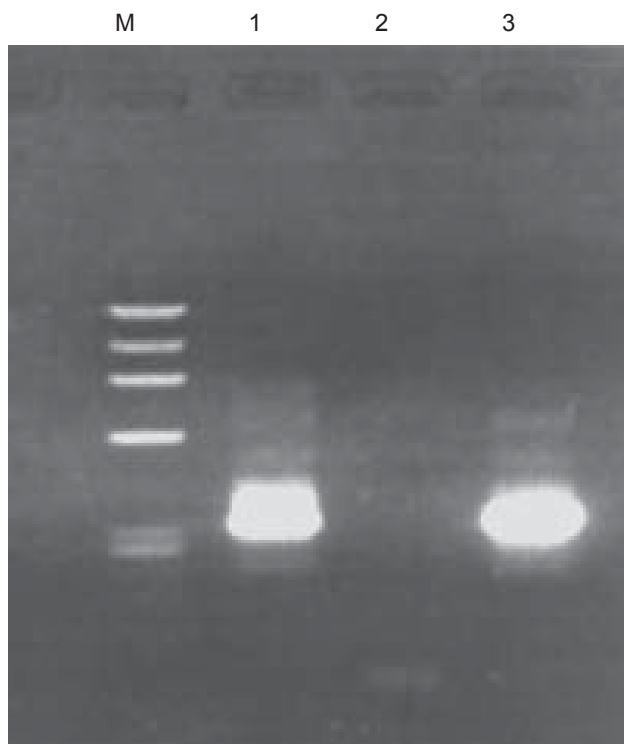
**Рис. 1.** Рестрикционный анализ продуктов ПЦР. Дорожки: М-маркер; 1-4 – продукт амплификации (466 пар оснований) при использовании энзимов рестрикции Hind III, Bgl I, Ava I, Alu I.

**Fig. 1.** Restriction analysis of PCR products. Trace strips: M-marker, 1-4 – amplification subsistence (466 base pairs) at using Hind III, Bgl I, Ava I, Alu I restriction enzymes.

менты  $D_1$  и  $D_2$  генома вируса ИРТ амплифицировали на матрице вирусной ДНК, выделенной из нативного и криоконсервированных образцов. При проведении реакции с праймерами  $D_1$  и  $D_2$  был получен продукт амплификации размером 466 пар оснований. В образцах со штаммом “Молдавский” от 11.08.1984 года не удалось получить продуктов амплификации.

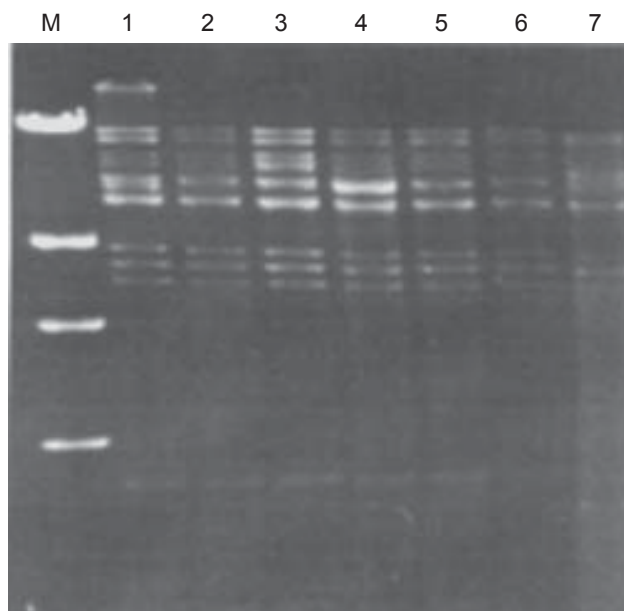
Специфичность полученного продукта была подтверждена с помощью рестрикционного анализа с эндонуклеазами рестрикции Hind III, Bgl I, Ava I, Alu I для фрагмента ДНК, полученного из штаммов “Монорин” от 09.02.1992 года и “Монорин” от 19.09.2002 года; “Молдавский” от 30.07.2003 года, хранившихся при умеренно низких температурах (рис. 1).

Продукты амплификации фрагмента ДНК также были получены для штамма “Монорин”, хранившегося при  $-196^{\circ}\text{C}$  в течение 2 лет 6 месяцев. Положительным контролем служил референтный штамм Соорег (рис.2). В этом случае для гидролиза использовали фермент Hind III. Анализ длины рестрикционных фрагментов (RFLP) подтвердил специфичность полученного участка ДНК (рис. 3).



**Рис. 2.** Продукты амплификации фрагмента ДНК для штамма “Монорин”, хранившегося при  $-196^{\circ}\text{C}$  в течение 2 лет 6 месяцев и референтного штамма “Соорег”. Дорожки: М – маркер; 1 – штамм “Монорин”; 2 – отрицательный контроль; 3 –референтный штамм “Соорег”

**Fig. 2.** Amplification products of DNA fragments for “Monorin” strain stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  during 30 months, and “Cooper” reference strain. Trace strips: M – marker, 1 – “Monorin” strain; 2 – negative control; 3 – “Cooper” reference strain.



**Рис. 3.** RFLP штаммов BHV1, рестрикция ферментом Hind III. Дорожки: М – маркер; 1-штамм “Соорег”; 2 – штамм “Монорин”; 3-7 – территориальные изоляты.

**Fig. 3.** RFLP BHV1 strains, by Hind III enzyme restriction. Lanes: M – marker, 1 – “Cooper” strain; 2 – “Monorin” strain; 3-7 – territorial isolates.

## Выводы

Проведенные исследования показали, что инфекционные свойства, проявлявшиеся характерным для данного вируса ЦПД, наблюдались у вирусов, хранившихся в течение 8 месяцев штамма “Молдавский” и 1 год 6 месяцев штамма “Монорин” в диапазоне температур от  $-18$  до  $-30^{\circ}\text{C}$ , а также штамма “Монорин”, хранившегося в жидком азоте в течение двух с половиной лет.

Изучение сохранности гликопротеина gB с помощью ИФА в образцах, хранившихся при умеренно низких температурах, показало отрицательный результат. Поскольку ИФА – высокочувствительный метод, можно сделать вывод, что в процессе замораживания и хранения в условиях умеренно низких температур произошла потеря или разрушение gB вируса ИРТ. Очевидно, что гликопротеин B при замораживании с использованием предложенных режимов не сохраняется в структуре вируса.

Исследования влияния низкотемпературного хранения при  $-196^{\circ}\text{C}$  и в диапазоне от  $-18$  до  $-30^{\circ}\text{C}$  на сохранность структуры ДНК показали, что специфичность амплифицированного фрагмента ДНК подтверждена для всех исследованных образцов, кроме штамма “Молдавский”, хранившегося 19 лет 7 месяцев при температурах в диапазоне от  $-18$  до  $-30^{\circ}\text{C}$ . Следовательно, во всех остальных образцах, хранившихся с использованием предложенных нами режимов замораживания, были сохранены специфические фрагменты ДНК соответствующие праймерам  $D_1$  и  $D_2$  для данного вируса.

## Литература

1. Волосьянко О.В. Засоби діагностики та профілактики інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби в Україні: Автореф. дис. ... д-ра ветеринарних наук.– Харків, 2003.– 46 с.
2. Гусева Е.В. Практический каталог современной классификации возбудителей наиболее распространенных болезней животных и птиц.– Владимир, 2002.– 121 с.
3. Дикий И.Л., Стегний М.Ю., Стегний Б.Т. и др. Микробиология. Лабораторная диагностика вирусных и прионных инфекций: Метод. рекомендации.– Харьков, 2002.– 17 с.
4. Жираковская Е.В., Орешкова С.Ф., Глотов А.Г. и др. Дифференциация изолятов вируса ИРТ КРС с помощью ПЦР-ПДРФ анализа // Ветеринария.– 2004.– №11.– С. 17-21.
5. Кузнецов Д.П., Самуйленко А.Я., Кузнецова С.В. и др. Диагностика инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа // Ветеринария.– 1990.– №10.– С. 59-60.
6. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.*– Paris, 2004.– Vol. 1.– 1178 p.
7. Schynts F., Baranowski E., Lemaire M., Thiry E. A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains // Vet. Microbiol.– 1999.– Vol. 66, N3.– P. 187-195.

Поступила 10.02.2006

temperature range from  $-18$  down to  $-30^{\circ}\text{C}$  as well as the strain “Monorin” stored in liquid nitrogen for 30 months.

Studying of the integrity of glycoprotein gB using IEA in the samples stored at moderately low temperatures has demonstrated negative result. Since the IEA is highly sensitive method it may be concluded that during the processes of freezing and storage under moderately low temperatures either loss or destruction of gB of the IBRT virus took place. Glycoprotein B during freezing using the proposed regimens is not likely preserved in virus structure.

Investigations of the effect of low temperature preservation at  $-196^{\circ}\text{C}$  and within the temperature range from  $-18$  down to  $-30^{\circ}\text{C}$  on the integrity of DNA structure have proved that specificity of amplified fragment of DNA is confirmed for all the studied samples except the “Moldavsky” strain stored for 235 months within the range of  $-18$  down to  $-30^{\circ}\text{C}$ . Therefore in the rest samples stored using the proposed by us freezing regimens the specific DNA fragments corresponding to the primers  $D_1$  and  $D_2$  for this virus were preserved.

## References

1. Volosyanko O.V. Diagnostic and prophylactic methods of trace strip of cattle in Ukraine. Author's abstract of thesis of doctor of veterinary sciences. Kharkov, 2003.– 46 p.
2. Guseva E.V. Practical catalogue of the agents of modern classification of the most widespread diseases in the animals and birds.– Vladimir, 2002. – 121 p.
3. Dikiy I.L., Stegnyy M.Yu., Stegnyy B.T. et al. Microbiology. Laboratory diagnostics of viral and prion infections. Methodical recommendations.– Kharkov, 2002. – 17 p.
4. Zhirakovskaya E.V., Oreshkova S.F., Glotov A.G et al. Differentiation of cattle infectious rhinotracheitis virus isolates by means of PCR-RFLP analysis // Veterinariya.– 2004.– N11.– P. 17-21.
5. Kuznetsov D.P., Samuylenko A.Ya., Kuznetsova S.V. et al. Diagnostic of trace of cattle infectious rhinotracheitis with immunoenzyme analysis method // Veterinariya.– 1990.– N10.– P. 59-60.
6. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.*– Paris, 2004.– Vol. 1.– 1178 p.
7. Schynts F., Baranowski E., Lemaire M., Thiry E. A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains // Vet. Microbiol.– 1999.– Vol. 66, N3.– P. 187-195.

Accepted in 10.02.2006