



10. **Ткаченко О.А.** Швидкоростучі *M. bovis* у проблемі туберкульозу / О.А. Ткаченко // Ветеринарна медицина України. – 2004. – № 7. – С. 14–17.
11. **Туберкулез** животных и меры борьбы с ним / Под ред. Ю.А. Кассича. – К.: Урожай, 1990. – 304 с.
12. **Туберкулез** сельскохозяйственных животных / [В.И. Ротов, П.И. Кокуричев, П.Е. Савченко, Ю.А. Трач]. – К.: Урожай, 1978. – 237 с.
13. **Voskuil M.I.** Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program / M.I. Voskuil, D. Schnappinger, K.C. Visconti, M.I. Harrell, G.M. Dolganov, D.R. Sherman, G.K. Schoolnik // *J. Exp. Med.*, 2003. – Vol. 198. – P. 705–713.
14. **Mutants** of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five *rpf*-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro / K.J. Downing, V.V. Mischenko, M.O. Shleeva, D.I. Young, M. Young, A.S. Kaprelyants, A.S. Apt, V. Mizrahi // *Infect. Immun.*, 2005. – Vol. 73. – P. 3038–3043.
15. **Regulation** of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alphacrystallin / D.R. Sherman, M. Voskuil, D. Schnappinger, R. Liao, M.I. Harrell, G.K. Schoolnik // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98. – P. 7534–7539.
16. **Tufariello J.M.** Individual *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth in vitro and in vivo / J.M. Tufariello, W.R. Jacobs, J. Chan // *Infect. Immun.* – 2004. – Vol. 72. – P. 515–526.
17. **Yuan Y.** Stationary-phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. / Y. Yuan, D.D. Crane, C.E. Barry 3rd // *J. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178. – P. 4484–4492.

Одержано 11.02.2013

Биологические свойства диссоциативных L- и других форм *M. bovis*. А.А. Ткаченко, И.Н. Шендрик, В.В. Мискив, А.В. Ковалёв
В статье рассматриваются *M. bovis*, которые отличаются по своим биологическим свойствам от патогенных штаммов.

Biological properties of the dissociative L- and other forms of *M. bovis*.
A.A. Tkachenko, I.N. Shendrik, V.V. Miskiv, A.V. Kovalev
This article focuses on *M. bovis*, which differ in biological properties of pathogenic strains. ○

УДК 578:579:636.2:619.9

О.Й. ГРИНЕВИЧ, докт. мед. наук
І.Г. МАРКОВИЧ, канд. мед. наук
І.В. ПОЛІЩУК, мол. наук. співробітник
І.Д. ЛУКАШ, мол. наук. співробітник
З.О. ЯЦУК, мол. наук. співробітник
Державна наукова установа «Державний центр інноваційних біотехнологій», Київ

Л.В. МАРУЩАК, мол. наук. співробітник
Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, Київ

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДНК ПРОВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЯК МЕТОД ОЦІНКИ ІНФІКОВАНОСТІ ТВАРИН

Лейкоз – це висококонтагіозне вірусне захворювання кровотворної системи тварин. Діагностика вірусу лейкозу зазвичай ґрунтується на виявленні специфічних антитіл, однак лише присутність провірусної ДНК, укоріненої в геном клітини, може виступати незаперечним критерієм інфікованості. Досліджено кров великої рогатої худоби на наявність вірусу лейкозу. Проведено кількісну оцінку вірусного навантаження у пробах крові.

Вивчення патогенезу лейкозу великої рогатої худоби відбувалося впродовж тривалого часу паралельно з вивченням мето-



дів діагностики, епізоотології й розроблення оздоровчих протилейкозних заходів [8]. В інфікованих тварин вірус лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) проникає в хромосомну ДНК лімфоцитів у формі провірусу в невеликій кількості (1–3) копій на диплоїдний геном [9]. Оскільки транскрипція вірусних білків усередині клітини заблокована, ВЛ ВРХ прихований і віремія в інфікованих тварин може не спостерігатися [10]. Антитіла утворюються, проте вони не здатні вплинути на вірус, і тварини залишаються носіями до кінця свого життя [7].

Діагностика вірусу лейкозу зазвичай заснована на виявленні специфічних антитіл, однак лише присутність провірусної ДНК, укоріненої в геном клітини, може виступати незаперечним критерієм інфікованості [9, 10]. Відкриття полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) стало видатною подією в діагностиці інфекційних захворювань, особливо вірусної етіології [1]. Метод ПЛР у режимі реального часу добре себе зарекомендував завдяки високій чутливості, специфічності й швидкості виконання [2, 4, 6].

Мета роботи – виявлення ДНК провірусу лейкозу ВРХ методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу та кількісне визначення вірусного навантаження у крові корів, інфікованих ВЛ ВРХ.

Об'єкт і предмет дослідження – кров великої рогатої худоби, хворої на лейкоз, вірус лейкозу.

© О.Й. Гриневич, І.Г. Маркович, І.В. Поліщук, І.Д. Лукаш, З.О. Яцук, Л.В. Марущак, 2013



МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для кількісного визначення ДНК провірусу лейкозу слугували зразки крові, які відбирали від корів у системи для відбору крові з 3% розчином ЕТДА (VACUTEST®, Італія) і відправляли до лабораторії у той же день. Зразки було протестовано на наявність ДНК провірусу лейкозу з використанням комплекту реагентів «ДНК-СОРБ-В» для екстракції ДНК і комплекту реагентів для проведення ПЛР з детекцією продуктів у режимі реального часу «Лейкоз», варіант FRT («ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзор», Росія). Цей комплект використовували для кількісного виявлення ДНК провірусу лейкозу великої рогатої худоби в біологічному матеріалі з детекцією продуктів у режимі реального часу з використанням приладу IQ5 («Bio-Rad», США) [3]. З метою визначення вірусного навантаження було протестовано 43 зразки крові тварин.

В основі методу – ампліфікація специфічної ділянки ДНК провірусу лейкозу великої рогатої худоби (послідовності, інтегрованої в ДНК лейкоцитів ВРХ) за рахунок багаторазового повторення циклів денатурації ДНК у досліджуваній пробі, відпалу специфічних олігонуклеотидних затравок (праймерів) і зондів, мічених флуоресцентними барвниками, та синтезу комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ферменту Taq-полімерази [5].

Для аналізу було використано набір «Лейкоз» з уже відомою концентрацією ДНК у позитивному контрольному зразку (ПКО ДНК BLV) – 4,5E+04 копій в мл (45 000 копій в мл).

Отримані дані у вигляді кривих накопичення флуоресцентного сигналу аналізували за допомогою програмного забезпечення системи для детекції ПЛР-продуктів у режимі «реального часу» IQ5.

Для кількісного визначення було приготовано серію 10-кратного розведення ПКО ДНК BLV. Стандартні зразки – це зразки з відомою концентрацією (табл. 1).

Стандартні зразки було використано для побудови калібрувальної кривої та як позитивний контроль.

Таблиця 1 – Концентрація розведення стандартних зразків ПКО ДНК BLV

Стандарт	Кількість копій в мл
ПКО ДНК BLV/1	4,5E+04
ПКО ДНК BLV/2	4,5E+03
ПКО ДНК BLV/3	4,5E+02
ПКО ДНК BLV/4	4,5E+01

За отриманими графіками ампліфікації визначали середнє значення Ct для кожного зразка й стандарту. Брали до уваги значення нахилу кривої ампліфікації (slope), ефективність ампліфікації (E) та коефіцієнт кореляції лінійної регресії (R²) калібрувальних графіків з використанням стандартів ПКО ДНК BLV.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

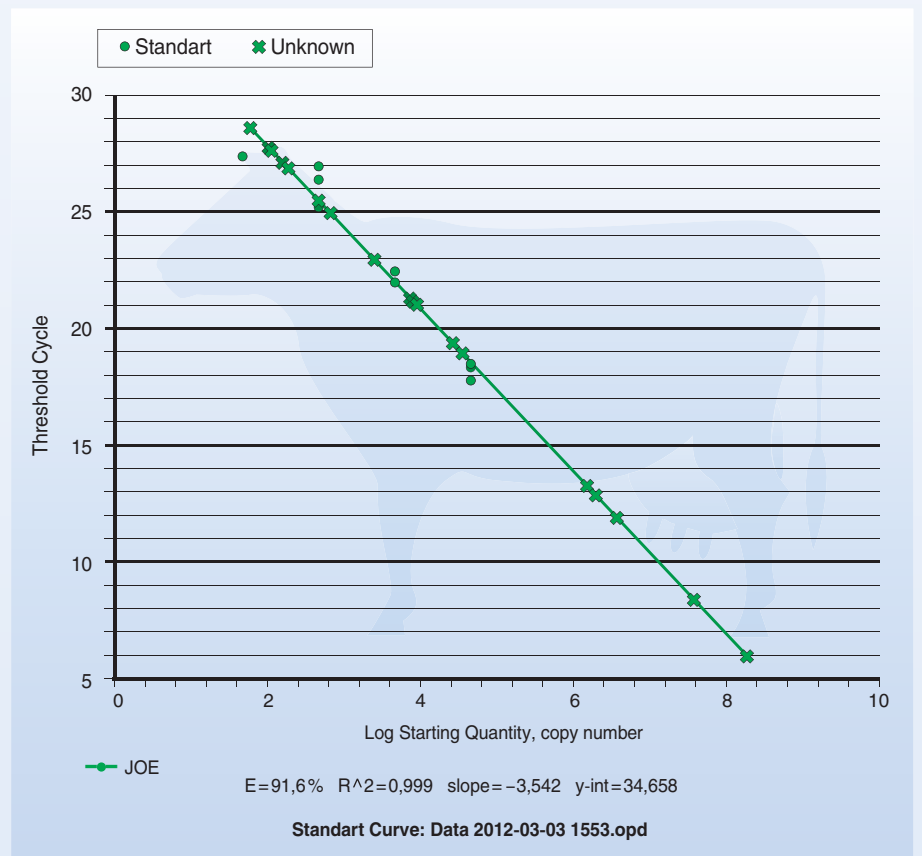
Аналітичні результати оцінювали за допомогою регресійного аналізу й побудови стандартного графіка залежності Ct від логарифма початкової концентрації субстрату. Ефективність ампліфікації визначали за значеннями нахилу $E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$ (див. рисунок).

При аналізі кривої ампліфікації було

встановлено, що показник нахилу становив -3,542, що свідчить про високий рівень ефективності ампліфікації (припустимі значення $-3,1 \geq slope \geq -3,6$); ефективність ПЛР – 91,6% і показник лінійності (R²) – 0,99 (припустимі значення $1 > R^2 > 0,99$). Ампліфікацію кожного зразка здійснювали у двох повторях, а стандартних зразків – у трьох.

За отриманими графіками ампліфікації визначали середнє значення вірусного навантаження для кожного зразка (табл. 2).

Отже, отримані дані свідчать про те, що метод серійних розведень є ефективним для кількісного визначення числа копій ВЛ ВРХ. Провірусне число копій ВЛ ВРХ, отримане методом ПЛР у режимі реального часу, було підтвержене коефіцієнтом кореляції лінійної регресії, який становив 0,99, що свідчить про високий рівень ефективності ампліфікації. У результаті досліджень встановили, що 19 проб (44,19%) були позитивними, кількість копій вірусу в них варіювала в діапазоні від 56 до 190×10⁶ в 1 мл крові.



Стандартний графік залежності Ct від логарифма початкової концентрації

Таблиця 2 – Результати кількісного аналізу зразків крові ВРХ методом ПЛР у режимі реального часу

Номер зразка	Середнє значення Ct	Середнє кількісне значення НК вірусу в мл
4	27,75	9,877E+01
9	25,45	4,561E+02
12	21,22	7,625E+03
15	21,29	7,259E+03
17	06,00	1,903E+08
18	13,27	1,511E+06
22	27,63	1,073E+02
24	26,88	1,769E+02
27	08,39	3,868E+07
31	12,87	1,961E+06
32	28,58	5,680E+01
33	24,94	6,395E+02
34	27,10	1,524E+02
36	20,99	8,890E+03
39	19,37	2,601E+04
40	22,96	2,401E+03
41	21,10	8,269E+03
42	11,91	3,731E+06
43	18,91	3,549E+04
ПКО ДНК BLV/1	18,22	4,500E+04
ПКО ДНК BLV/2	22,15	4,500E+03
ПКО ДНК BLV/3	26,18	4,500E+02
ПКО ДНК BLV/4	28,99	4,500E+01

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що метод кількісного визначення ДНК провірусу лейкозу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією в режимі реального часу є досить чутливим та ефективним на різних етапах розвитку інфекційного процесу.

2. Опрацьований метод серійних розведень є ефективним для кількісного визначення числа копій ВЛ ВРХ. Результати, отримані методом ПЛР у режимі реального часу, свідчать про високий рівень ефективності ампліфікації ($R^2 - 0,99$).

3. Використання методу кількісного визначення ДНК провірусу лейкозу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції не лише дозволяє виявити інфікованих тварин на найбільш ранніх стадіях захворювання, а й дає змогу в майбутньому оцінювати ефективність препаратів, рекомендованих для профілактики й лікування лейкозу ВРХ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Антонов Б.И.** Использование метода ПЦР при диагностике острых инфекционных болезней животных / Б.И. Антонов // Ветеринарный консультант. – 2002. – № 16–17. – С. 22.
- Гриневич О.Й.** Використання різних методів діагностики з метою вивчення інфекційного процесу на прикладі лейкозу великої рогатої худоби / О.Й. Гриневич, І.Г. Маркович, Г.А. Завірюха // Ветеринарна медицина України. – 2012. – № 11 (201). – С. 20–23.
- Инструкция** по применению тест-системы «ЛЕЙКОЗ» для выявления вируса лейкоза крупного рогатого скота (КРС) методом полимеразной цепной реакции (организация-производитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва). – 2009. – 19 с.
- Іщенко Л.М.** Показники молекулярно-генетичного та серологічного методів діагностики за експериментального зараження овець вірусом лейкозу великої рогатої худоби / Л.М. Іщенко, В.Г. Спиридонов, В.Д. Іщенко, В.О. Бусол, С.Д. Мельничук, Л.В. Коваленко // Наук. вісник вет. медицини: Зб. наук. праць. – Біла Церква, 2012. – Вип. 9 (92). – С. 70–74.
- Подымалкин А.А.** Использование метода Real-Time PCR для диагностики генетической устойчивости КРС к лейкозу // Эл. ресурс: http://www.biotech-bryansk.net/files/news/b_A0514E5A-53E6-4F46-B765-DA28B6922049.pdf.
- Спиридонов В.Г.** Діагностика лейкозу великої рогатої худоби методом двостадійної полімеразної ланцюгової реакції (Методичні рекомендації) / В.Г. Спиридонов, Л.М. Іщенко, Д.Ю. Рибальченко, Д.Л. Мартиненко, С.Д. Мельничук, Д.М. Мельничук, В.О. Бусол, І.П. Григорюк. – К.: Вид. центр НУБІП України, 2011. – 25 с.
- Beier D.** Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing / D. Beier, P. Blankenstein, O. Marquardt, J. Kuzmak Berl // MUnch. TierSrzll. Wsclir. – 2001. – Т. 114. – P. 252–256.
- Jimba M.** BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm / M. Jimba et al. // Retrovirology. – 2010. – Vol. 7. – P. 91.
- Rice N.R.** The nucleotide sequence of the env gene and the post-env region of bovine leukemia virus / N.R. Rice, R.M. Stephens,

D. Couez, J. Deschamps, R. Keltmann, A. Burny, R.V. Gilden // Virology. – 1984. – Vol. 138. – P. 82–93.

- Sagata N.** Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: It's evolutionary relationship to other retro-viruses / N. Sagata, T. Yasunaga, J. Tsuziiku-Kawnmurn, K. Ohishi, Y. Ogawa, Y. Ikawa // Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). – 1986. – Vol. 82. – P. 677–681.

Одержано 26.03.2013

Количественное определение ДНК про-вируса лейкоза крупного рогатого скота как метод оценки инфицированности животных.

А.И. Гриневич, И.Г. Маркович, И.В. Полищук, И.Д. Лукаш, З.А. Яцук, Л.В. Марущак

Лейкоз – вирусное заболевание кроветворной системы животных. Диагностика вируса лейкоза обычно основана на выявлении специфических антител, однако только присутствие провирусной ДНК, внедренной в геном клетки, может служить неоспоримым критерием инфицированности. Статья посвящена выявлению ДНК провируса лейкоза КРС методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и определению вирусной нагрузки в крови коров, инфицированных ВЛ КРС. Установлено, что для количественного определения числа копий ВЛ КРС эффективным является метод количественного определения ДНК провируса лейкоза с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Quantitative determination of DNA provirus bovine leukemia – a method for assessing the infection of animals.

O. Grynevych, I. Markovych, I. Polishchuk, I. Lukash, Z. Yatsuk, L. Maruschak

Leucosis is a viral disease of the blood system of animals. Diagnostics bovine leukemia virus, usually based on the detection of specific antibodies, however, only the presence of proviral DNA embedded into the cell's genome, can serve as indisputable criterion of infection. Article is devoted to revealing DNA leucosis provirus by polymerase chain reaction in the «real-time» and the viral load in the blood of cows infected with BLV. Is established that the method of of quantitative determination of leukemia provirus DNA by polymerase chain reaction (PCR)-hybridization with fluorescent detection mode in «real time» is effective to quantify the number of copies of BLV. ◉