

Висновки. Запропонована нова технологія створення пробіотика на основі молочнокислих бактерій з використанням різних варіантів захисних середовищ з метою їх ліофілізації, які підтримують і підвищують основні терапевтичні функції лактобактерій.

Список літератури

1. Вольська, О. Г. Вибір наповнювачів для готових лікарських форм препаратів на основі селекціонованих штамів лактобацил [Текст] / О. Г. Вольська та інш. // Одеський медичний журнал. — 2006. — № 5(97). — С. 3-6. 2. Гужвинська, С. О. Застосування пробіотиків у птахівництві [Текст] / С. О. Гужвинська // Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб. — Х. — 2003. — Вип. 53. — С. 552 - 556. 3. Кігель, Н. Ф. Технології бактеріальних препаратів для функціональних продуктів і біологічно активних добавок [Текст]: автореф. дис. д-ра техн. наук: 03.00.20 / Н. Ф. Кігель; [Укр. держ. ун-т харч. технологій]. — К., 2003. — 46 с. 4. Квасников, Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования [Текст] / Квасников Е.И., Нестеренко О.А.- М., Наука, 1975. — 384 с. 5. Яновський, Д. С. Мікробіологічна характеристика системи «організм господаря — мікробіоценози різних екологічних ніш» як основа створення мультипробіотиків нових поколінь [Текст]: автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.07 / Д. С. Яновський; [І-т мікробіології та імунології ім. І. І. Мечнікова]. — Харків, 2006. — 52 с.

PRODUCTION TECHNOLOGY OF PROBIOTIC FOR AVIAN

Gujvinskaya S.A.

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

Results on production technology of probiotic for avian based on lactobacilluses with using of different variants of shielding media at lyophilization are presented in the article. Tests of antagonistic features of probiotic to opportunistic pathogenic microflora in conditions in vivo have been conducted. We recommend to use protectants at production of probiotics.

УДК 619:616-07.006

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРС

Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Ломакина Н. Ф., Иванова Л.А., Лопунов С.В.

ГНУ ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко, Москва

В статье рассматривается область применения ПЦР в диагностике и изучении лейкоза КРС, исходя из особенностей течения заболевания.

Лейкоз КРС широко распространен по всему миру, включая Россию, и наносит существенный экономический урон странам с развитым животноводством. Поскольку на текущий момент нет способов предупреждения и лечения лейкоза КРС, существует две альтернативы: игнорировать или искоренять болезнь. Выбор стратегии зависит от экономического состояния субъекта, будь то страна или отдельное хозяйство. На сегодняшний день лейкоз КРС фактически полностью ликвидирован в странах Евросоюза в результате проведения многолетних мероприятий по выбраковке инфицированных животных. В России лейкоз КРС официально регистрируется с 1965 г.,—хотя первые случаи болезни относятся к 1927 году, - и занимает одно из первых мест в списке наиболее распространенных заболеваний. На протяжении ряда десятилетий в Российской Федерации проводится комплекс мероприятий по борьбе с лейкозом, которые регламентированы «Правилами по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота» (утверждены МСХ и ПРФ 11.05.1999 N 399).

По мере развития научно-методологической базы и накопления знаний об особенностях течения болезни и его возбудителе, менялась тактика диагностики и борьбы с этим заболеванием.

Изоляция из стада инфицированных животных с последующей их заменой здоровым молодняком, а также ликвидация вируса в популяции быков-производителей на племенных предприятиях составляют суть противолейкозных мероприятий. Эффективность проводимых мер во многом зависит от методов, которые используют для обнаружения вирусной инфекции, с учетом возраста и условий содержания

животных. Мероприятия, проводимые до 1988 г на основе результатов гематологических и патоморфологических диагностических исследований, не дали желаемых результатов, поскольку используемые методы выявляли патологические изменения, характерные для поздних стадий лейкоза. На смену им пришли высокоспецифичные, чувствительные и технологичные методы прижизненной диагностики, позволяющие обнаружить и изолировать инфицированных животных на самых ранних стадиях заболевания, чтобы не допустить в стаде распространения инфекции.

Зараженный вирусом лейкоза крупный рогатый скот способен инфицировать здоровых животных. В течение заболевания, которое характеризуется усиленной пролиферацией лимфоидных клеток кроветворной ткани с нарушением их дифференциации и последующим образованием опухолей в кроветворных и других органах. После заражения инфекционный процесс претерпевает стадийный путь развития. Используемые современные методы диагностики позволяют дифференцировать четыре стадии заболевания.

Инкубационный период длится с момента инфицирования до появления первых признаков развития инфекции, при экспериментальном заражении составляет 8-14 суток, а в естественных условиях — 60-90 суток и более.

Бессимптомная стадия, в течение которой животное, не имея клинических признаков, является источником инфекции, характеризуется появлением антител ВЛКРС. На этой стадии возможно выявление антител и провирусной ДНК в крови и других органах. Этот период может длиться от нескольких месяцев до трех и более лет и приводит к клинко-гематологической стадии, которая проявляется персистентным лимфоцитозом и другими нарушениями картины крови.

Опухолевая стадия, характеризующаяся появлением злокачественных образований в кроветворных и других органах и тканях, неизбежно приводит к гибели животных.

Естественным хозяином вируса лейкоза считается крупный рогатый скот, однако, в природе инфицирование наблюдали у буйволов, овец и капибар (по данным МЭБ). Экспериментально вирусом лейкоза КРС удавалось инфицировать многие виды животных, включая кроликов, крыс, кур, свиней, коз, овец. Источником распространения болезни являются инфицированные животные, от которых инфекция может передаваться через кровь, молоко, молозиво, с носовыми истечениями и другими секретами [1].

Лейкоз крупного рогатого скота — хроническое инфекционное заболевание с необратимым процессом, вызываемое вирусом лейкоза (ВЛКРС), который преимущественно поражает В лимфоциты.

Вирус лейкоза крупного рогатого скота принадлежит роду Deltaretrovirus семейства Retroviridae, к которому также относятся и вирусы Т-клеточной лейкемии человека типа 1 и 2 (HTLV-1, HTLV-2). Отличительной особенностью ретровирусов является их способность встраиваться в геном хозяина и в интегрированном виде пожизненно персистировать в организме, вызывая выработку специфических антител. Таким образом, о наличии инфекции можно судить на основании выявления как вирусного генома (антигена), так и специфических антител.

В настоящее время в диагностике лейкоза широко используются рекомендованные МЭБ методы: реакция иммунодиффузии (РИД или РДП), иммуно-ферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Геном ВЛ КРС представлен одноцепочечной РНК, которая содержится только в зрелых вирионах и в жизненном цикле вируса функционирует всего один раз в роли матрицы для образования комплементарной ДНК на стадии обратной транскрипции, осуществляемой вирусным ферментом ревертазой. В процессе репликации вируса образуется двухцепочечная молекула ДНК, называемая провирусом. Она может существовать в виде кольцевой формы и произвольным образом встраиваться в геном хозяина. Схематично организацию генома вируса/провируса лейкоза можно представить как 5'LTR-gag-pol-env-X(Tax/Rex)-3'LTR. В настоящий момент хорошо изучены строение и стадии жизненного цикла вируса/провируса лейкоза КРС, накоплен обширный материал по развитию и течению лейкоза у экспериментально инфицированных животных, который детально изложен в обзоре [1].

В разработке серологических и молекулярно-биологических методов диагностики лейкоза на сегодняшний момент внимание заслуживают три области вирусного генома и кодируемые ими белки. Это гены *gag*, *pol* и *env*, которые считаются наиболее консервативными и используются для детекции методом ПЦР. Присутствующие в их составе вариабельные участки позволяют судить о генетическом разнообразии вирусов лейкоза КРС, распространенных в разных регионах мира [2,3].

Антитела к вирусным белкам *gp51* и *p24* имеют важное диагностическое значение среди антител, вырабатываемых в организме инфицированных животных. Капсидный белок *p24* относится к внутренним структурным белкам, кодируемым геном *gag*, а гликопротеид *gp51* — продукт гена *env* — считается главным поверхностным белком вирусной оболочки. Антитела к *gp51* являются ранними (их можно обнаружить через 2 недели после заражения), образуются в более высоком титре и раньше, чем антитела к *p24*. Поэтому современные диагностические наборы для РИД и ИФА предназначены в основном для выявления антител к *gp51* и по своей чувствительности превосходят реакции, в которых используется в качестве антигена белок *p24*. Количественное соотношение антител против *p24* и *gp51* связано со стадией инфекционного процесса.

Серологические методы РИД и ИФА позволяют обнаружить антитела к белкам вириона ВЛКРС в сыворотке крови. Чувствительность ИФА в 10-100 раз превышает чувствительность РИД и позволяет исследовать биологические жидкости с низким содержанием антител, например, молоко и молозиво животных.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) способна идентифицировать фрагменты вирусного генома или провирусной ДНК в лимфоцитах периферической крови, разных биологических секретах и органах животных.

К преимуществам ПЦР, помимо специфичности, относится высокая чувствительность метода и, как следствие, возможность выявления провируса на ранних стадиях инфекционного процесса, до того момента, как образуются антитела и станет возможным их определение [4]. При экспериментальном инфицировании овец провирус в крови удавалось обнаружить на 6-10-й день после заражения. Исследования в животноводческих хозяйствах, показали, что метод ПЦР позволяет выявить инфицированных вирусом лейкоза животных на 1-8 недель раньше, чем методы РИД и ИФА.

Расхождение результатов серологических исследований и ПЦР вполне объяснимо и, прежде всего, свидетельствует об актуальности комплексного подхода при постановке диагноза.

Выделяют две группы животных: серопозитивные (Ат+) отрицательные в ПЦР (ПЦР-) и серонегативные (Ат-) положительные в ПЦР (ПЦР+) при более детальном исследовании случаев несовпадения результатов серологии и молекулярной диагностики (ПЦР).

Случаи серонегативных ПЦР-положительных животных можно объяснить низким уровнем выработки антител, не достигших порога чувствительности серологических методов. Такое состояние характерно для ранней стадии инфицирования. Как правило, повторное исследование спустя несколько недель и даже месяцев, выявляет специфические антитела в ИФА или РИД.

Известны случаи, когда у инфицированных животных на протяжении длительного периода наблюдался крайне низкий уровень антител в крови или их отсутствие, и, наоборот, у животных с высоким уровнем АТ не удавалось обнаружить провирус в крови [1,5].

Причины подобного явления, скорее всего, связаны с индивидуальными особенностями организма хозяина. У некоторых животных интегрированный провирус способен долгое время не экспрессироваться, что объясняет длительный латентный период (от нескольких месяцев до нескольких лет) заболевания, в течение которого антитела к вирусу в крови не обнаруживаются, но животное является источником инфекции. Другой причиной отсутствия антител может быть толерантность организма животного к возбудителю вследствие внутриутробного заражения плода до развития иммунокомпетентности.

Вполне возможно, отсутствие провируса в периферической крови связано с неизученными закономерностями миграции инфицированных ВЛ КРС лимфоцитов из лимфатической системы в кровеносную [4].

У здоровых телят, рожденных от инфицированных коров, в возрасте до 6-месяцев может наблюдаться высокий уровень противовирусных антител, обусловленный колостральным иммунитетом. В этом случае именно ПЦР позволяет дифференцировать инфицированных и здоровых животных. Помимо биологических причин, объясняющих несоответствие наблюдаемой картины исследований, могут быть и технические причины, непосредственно связанные с методом и качеством используемых диагностических систем.

Хорошей тест-системой для индикации того или иного возбудителя считается та, которая позволяет с максимальной специфичностью обнаружить минимальные количества его генома в анализируемом материале. Стандартная (одностадийная) ПЦР имеет определенный предел чувствительности, который в конечном итоге зависит от способности регистрирующей видеосистемы или человеческого глаза распознавать видимый продукт амплификации после его разгонки в электрофорезе. Чем больше специфического продукта образовалось, тем легче его увидеть, поэтому задача сводится к поиску оптимальных условий, обеспечивающих наибольший выход продукта ПЦР.

В арсенале разработчиков находится ряд приемов, позволяющих создать универсальные тест-системы с высокой чувствительностью. К таким приемам относится использование вырожденных праймеров, которые представляют собой набор олигонуклеотидов с одинаковой структурой, отличающихся лишь нуклеотидом в одной или двух (не более) фиксированных позициях, дабы охватить все возможные варианты нуклеотидов, наблюдаемые в природе.

Количество амплификата можно увеличить за счет повторной ПЦР (реамплификация), но использование одних и тех же праймеров в двух последовательных реакциях (две стадии ПЦР) приводит к накоплению неспецифических фрагментов, которые становятся видимыми на фореграмме и затрудняют прочтение результата. Поэтому для повторной ПЦР берут другую — «внутреннюю» — пару праймеров и реакцию проводят в свежей реакционной смеси с алиquotой продукта первого этапа ПЦР в качестве матрицы. Такой подход, называемый «гнездовой» ПЦР (nested PCR), позволяет увеличить чувствительность на 2-3 порядка, но при этом возрастает риск ложноположительных результатов, к которым может привести перекрестная контаминация при неаккуратной работе.

Существует ряд правил, выполнение которых помогает избежать контаминации. Однако некоторые исследователи предпочитают применять альтернативные методы, чтобы повысить специфичность ПЦР и избежать ложноположительных результатов. К ним относится гибридизационно-ферментный метод ПЦР или ПЦР-ИФА. ПЦР проводят в обычных условиях с использованием модифицированных праймеров или дНТФ, позволяющих их идентификацию. После этого проводят детекцию в планшетах для ИФА, используя методики и оборудование, применяемые в ИФА.

С развитием новых технологий появились разработки по обнаружению провируса ВЛ методом ПЦР в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Принципиальной особенностью является проведение всего процесса в одной пробирке, что снижает количество манипуляций и риск перекрестной контаминации, позволяет регистрировать и интерпретировать полученные результаты благодаря использованию специального прибора, который значительно упрощает проведение и сокращает время анализа. Повысить чувствительность удалось благодаря комбинированному использованию гнездовой ПЦР и ПЦР в реальном времени. Первую стадию амплификации с внешними праймерами проводили в обычных условиях, а вторую — с внутренними праймерами — в режиме реального времени на специальном оборудовании [6].

По сравнению с РИД и ИФА методы ПЦР и ПЦР в реальном времени остаются на сегодняшний день более дорогостоящими и трудоемкими, поэтому имеют ограниченное применение в диагностике лейкоза. По экономическим соображениям при проведении плановых оздоровительных мероприятий целесообразно использовать ПЦР в качестве дополнительного подтверждающего теста для исследования проб, отрицательных в РИД и ИФА, а также в случаях, когда серологические методы неэффективны:

- диагностика инфекции у телят моложе 6 месяцев на фоне персистирования ко-лостральных антител;
- дифференциальная диагностика между энзоотическим и спорадическим лейкозами;
- исследование импортированного скота, находящегося в карантине;
- выявление инфицированных животных с низким уровнем антител или не имеющих антител вследствие толерантности к ВЛКРС.

Внедрение ПЦР, развитие технической базы, диагностических лабораторий, появление и совершенствование новых методов расширило границы и возможности изучения лейкоза, позволило на молекулярном уровне исследовать генетические особенности вируса лейкоза и его функционирование. В первую очередь, это касается определения нуклеотидных последовательностей. На сегодняшний день в нуклеотидном банке представлено 7 полноразмерных нуклеотидных последовательностей изолятов вируса лейкоза из Японии, США, Бельгии и Австралии, и около полусотни последовательностей разных фрагментов генома из стран Европы, Азии, Северной и Южной Америки.

Хотя между вирусами лейкоза КРС не отмечено серологических различий, отличия в отдельных участках генома (gag, env и др.) провирусов обнаружили на молекулярном уровне при сравнении нуклеотидных и аминокислотных последовательностей изолятов из разных географических мест [2,3].

Примером могут служить исследования гена env, который кодирует оболочечные белки gp51 и gp30, ответственные за выработку антител. В их структуре выделяют высоко консервативные и вариабельные участки. Один из вариабельных участков длиной 444 п.н. (gp51, фрагмент 5099-5542 по K02120) использовали для изучения генетического разнообразия вирусов (провирусов) BLV.

Важный вопрос, который волнует лейкозологов, касается серонегативных животных инфицированных ВЛ. Чем обусловлено отсутствие или низкий уровень антител у некоторых хронически инфицированных животных? Связано ли это с особенностями организма животного или вызвано определенными вариантами вируса? Попытки найти ответ на эти вопросы пока не увенчались успехом. Рядом исследователей не установлено корреляции между генотипом гена env и его способностью вызывать разную степень иммунного ответа [3].

Что касается возможной роли особенностей строения провируса у серонегативных животных, то необходимо большее количество информации о структуре полного генома провирусов и функции определенных генов. Таким образом, в настоящее время идет стадия накопления материала, который позволит в будущем провести статистический анализ, сделать соответствующие выводы и поставить необходимые эксперименты.

В итоге, применительно к лейкозу КРС метод ПЦР может быть использован, прежде всего, в практических целях, как дополнительный метод диагностики в сочетании с РИД и ИФА для обследования серонегативных животных в неблагополучных по лейкозу хозяйствах, телят в возрасте до 6 месяцев, а также при исследовании импортированных и племенных животных. В научных целях, определение первичной структуры вируса лейкоза из разных административных и географических мест позволит оценить генетическое разнообразие циркулирующих вирусов, установить их филогенетическое родство и проследить эволюцию. В спорных случаях, связанных с импортом скота, определение нуклеотидной последовательности ВЛ КРС может помочь в выяснении источника инфицирования животных.

Список литературы

1. Gillet, N., Florins, A., Boxus, M. et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. // *Retrovirology*. — 2007. — V.4. — p. 18-50. 2. Dube, S., Bachman, S., Spicer, T. et al. Degenerate and specific PCR assays for the detection of bovine leukaemia virus and primate T cell leukaemia / lymphoma virus pol DNA and RNA: phylogenetic comparisons of amplified sequences from cattle and primates from around the world. // *J. General Virol.* — 1997. — V. 78. — p.1389-1398. 3. Licursi, M., Inoshima, Y., Wu, D. et al. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. // *Virus Res.* — 2002. — V. 86 (1-2). — p. 1-10. 4. Klintevall, K., Ballagi-Pordány, A., Näsund, K. et al. Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. // *Vet Microbiol.* — 1994. — V. 42 (2-3). — p. 191-204. 5. Fechner, H., Blankenstein, P., Looman, A.C. et al. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. // *Virology*. — 1997. — Oct 27; 237 (2). — p. 261-269. 6. Спиридонов, В.Г., Ищенко, Л.М., Мельничук, С.Д. Применение метода ПЦР в реальном времени для диагностики лейкоза крупного рогатого скота. / Сб. тр.: VI Всероссийск. н.-пр. конф. «Генодиагностика инфекционных болезней — 2007» (Молекулярная диагностика — 2007), 28-30 нояб., Москва, под ред. В.И.Покровского. — 2007. — Т.2 — С. 60-62.

APPLICATION OF PCR FOR THE DETECTION OF BOVINE LEUCOSIS VIRUS

Gulyukin M.I., Kozyreva N.G., Lomakina N.F., Ivanova L.A., Lopunov S.V.

All Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya.R. Kovalenko, Moscow

Application of PCR for diagnostics and study of bovine leucosis, on the basis of peculiarities of this disease course, is considered in the paper.

УДК 597.2/.5:579.843(262.54)

РОЛЬ ГАЛОФИЛЬНЫХ ВИБРИОНОВ В ВОЗНИКНОВЕНИИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ АЗОВО-ЧЕРНОМОРСКОГО БАССЕЙНА

Гурина Л.М.¹

Крымская опытная станция Национального научного центра «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины»

В статье приведены данные по бактериологическому мониторингу выделенных культур галофильных вибрионов и их роль в возникновении инфекционных заболеваний основных промысловых рыб и других гидробионтов Азово-Черноморского бассейна. Представлены результаты бактериологических исследований 15 видов основных промысловых рыб, 1 вида черноморских мидий, 2 видов рапанов, морской и пресной воды. Выделено 108 культур микроорганизмов.

Развитие морского промысла и искусственного воспроизводства морских рыб тесно связано с проблемой их заболеваний. Заболевания разной этиологии могут снижать численность естественных популяций рыб, вызывать их массовую гибель.

Вследствие ухудшения условий окружающей среды появляется все больше заболеваний, которые раньше не регистрировались. Особое внимание заслуживают заболевания, которые вызываются галофильными вибрионами и являются этиологическим агентом вибриоза у рыб [1–3]. Течение и клиническая картина вибриоза различаются у разных видов рыб, но имеют некоторые общие признаки (кровоизлияния, некрозы и язвы на поверхности тела).

Вибриоз протекает быстро, с высокой летальностью, или хронически и наносит ощутимый урон, особенно отечественным садковым хозяйствам.

Вибрионы широко распространены на земном шаре и являются естественными обитателями пресных и соленых водоемов, а также гидробионтов, обитающих в них. Вибрионы многих видов являются галофильными.

Галофильные вибрионы обитают в морях, океанах, озерах, в воде которых концентрация соли колеблется от 5 до 30 ‰. Эти микроорганизмы могут длительно вы-

¹ Науковий керівник — д-р вет. наук, проф. Ковалев В.Л.