

Таблица 5 — Определение чувствительности штамма *S. enteritidis* к антибиотикам

№	Название антибиотиков	Зона подавления роста (в мм)			
		До 0,5	0,5-1,0	1,0-1,5	С 1,5
1	Амикацин	+	+	+	+
2	Метилмецин	+	+	+	+
3	Каномицин	+	+	+	+
4	Цефуроксим	+	+	+	-
5	Цефазолин	+	+	+	-
6	Цефтазидим	+	+	+	+
7	Цефалексин	+	+	-	-
8	Карбенциллин	+	+	+	+
9	Левомецетин	+	+	+	+
10	Цефалотин	+	+	-	-
11	Офлоксацин	+	+	+	+
12	Тетрациклин	-	-	-	-
13	Цефотаксим	+	+	+	+
14	Ампициллин	+	+	+	-
15	Полимиксин	+	+	-	-
16	Ципрофлоксацин	+	+	+	+
17	Фураданин	+	+	+	-
18	Стрептомицин	+	-	-	-
19	Гентамицин	+	+	-	-
20	Цефтриаксон	+	+	+	+

Примечание: «+» - наличие чувствительности к антибиотикам;
«-» - отсутствие чувствительности к антибиотикам.

Таблица 6 — Исходные данные для расчета LD₅₀ выделенной культуры штамма *S. enteritidis*

Разведение бульонной культуры	Доза (микробных клеток)	Число зараженных белых мышей	Пало	Выжило
10 ⁻³	1600	5	5	0
10 ⁻⁵	800	5	5	0
10 ⁻⁷	400	5	2	3
10 ⁻⁹	200	5	3	2
10 ⁻¹¹	100	5	1	4

Заключение. Результаты исследования по изучению культурально-морфологических и ферментативных свойств выделенных штаммов сальмонелл показали, что данные микроорганизмы являются представителями семейства Enterobacteriaceae, рода *Salmonella*, вид *S. enteritidis*.

Литература. 1. Борьба с сальмонеллезом: роль ветеринарии и пищевой гигиены / пер. с англ. Г.А. Медведковой // Докл. комитета экспертов ВОЗ. - Женева, 1991 - С. 25-77. 2. Даровских, С.В. Биологические свойства бактерий *Salmonella enteritidis*, изолированных от телят / С.В. Даровских // Ученые записки: [сборник научных трудов]. - Ред. А.И. Ятусевич [и др.] - Витебск: УО ВГАВМ. - 2006. - Т. 42, вып. 2, ч. 1. - С. 66 - 69.

УДК 619:578.825.15:636.2

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ REAL-TIME ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Максимович В.В., Красочко П.П., Квач С.В.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

Приведены данные по разработке количественной полимеразной цепной реакции для выявления вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Чувствительность данной методики позволяет определить в образце наличие вируса с концентрацией 2 lg.

Data on working out quantitative polymerase chain reaction for revealing of bovine rhinotracheitis virus infectious of cattle. Sensitivity of the given procedure allows to define in the sample presence of a virus with concentration 2 lg.

Введение. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота (ИРТ КРС) – это остро протекающая контагиозная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся преимущественно катарально-некротическими поражениями дыхательного тракта, лихорадкой, общим угнетением и конъюнктивитом, а также развитием пупулезного вульвовагинита, при попадании вируса в половые органы животного и абортными.

Особенностью данного вируса является его длительная персистенция в организме животных после пере-

болевания и выделение с различными секретами (носовыми истечениями, слезами, спермой, молоком и т.д.). Такие животные являются потенциальным источником распространения заболевания.

Для их выявления существует достаточно много чувствительных серологических реакций, с помощью которых можно выявлять специфические противовирусные антитела. Это иммуноферментный анализ, реакции нейтрализации и непрямой гемагглютинации и т.д. Однако с их помощью достаточно сложно выявить животных-вирусоносителей, так как с помощью применяемых методов практически невозможно провести дифференциацию поствакцинальных от постинфекционных специфических антител.

Наиболее перспективными в настоящее время являются молекулярно-генетические методы, в частности, полимеразная цепная реакция (ПЦР). Данный метод основан на применении праймеров (специфических олигонуклеотидов), фланкирующих уникальные последовательности участков нуклеиновой кислоты вируса, по которым можно проводить специфическую идентификацию возбудителя. Преимуществами данного метода являются прямое определение возбудителя, а не продуктов жизнедеятельности возбудителя (например, при ИФА выявляются белки-маркеры, что дает лишь опосредованное свидетельство наличия инфекции), высокая чувствительность и специфичность (для ПЦР достаточно 10-100 клеток возбудителя), высокая скорость получения результатов, а также возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций.

Данная методика *real-time* ПЦР основана на применении высокоспецифичного зонда МВ (сконструирован по технологии «молекулярных маячков» - *molecular beacons*), который при связывании со специфическим участком ДНК создает репортерную флюоресценцию. Благодаря использованию ПЦР в режиме реального времени снижается время проведения анализа за счет отсутствия пост-ПЦР процедур (электрофоретический анализ ПЦР продуктов), что снижает вероятность контаминации лабораторных помещений ампликонами, а также повышает чувствительность реакции (детектируется двукратное увеличение продукта, в то время как на геле даже 10-ти кратное увеличение продукта трудноразличимо).

Таким образом, разработанный метод *real-time* ПЦР является высокочувствительным и специфичным и позволяет в краткие сроки определять не только животных с остро протекающей формой ИРТ, но и латентно больных вирусоносителей.

Материалы и методы. В работе использовали вакцинные штаммы вируса ИРТ КРС КМИЭВ-6 (БелНИИЭВ) и ТК-А.

Подбор праймеров и зонда осуществлялся с помощью программы «AlleleID» v6.0 на основе полных и частичных нуклеотидных последовательностей различных штаммов и изолятов вируса ИРТ из международного банка нуклеотидных последовательностей (GenBank).

Выделение ДНК осуществляли методом фенольной экстракции и с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN.

Постановку ПЦР проводили в *real-time* амплификаторе «Bio-Rad IQ5» (США) по двум методикам: с использованием красителя SYBR GREEN и с помощью зонда, сконструированного по технологии *molecular beacon*.

Реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, состав и температурный цикл которой был различным в зависимости от этапа проводимого исследования.

Положительный контроль для калибровочной кривой получали путем клонирования ампликона, полученного с помощью праймеров BF1 и BR1 с использованием в качестве матрицы ДНК штамм вируса КМИЭВ-6, в плазмиду рХСМ1 (The cloning vector collection, Япония). Полученную плазмиду нарабатывали стандартными молекулярно-биологическими методами, определяли ее концентрацию спектрофотометрически и делали серию разведений 10^2 — 10^5 .

Температурные профили денатурации получали, подвергая растворы зонда (0,3 μ M) и зонда с положительным контролем (0,3 μ M и 0,9 μ M соответственно) постепенному снижению температуры с 94°C до 30°C и снятием показаний уровня флюоресценции с шагом 1°C продолжительностью 1 мин и предварительным прогреванием при 94°C в течение 5 мин в приборе «Bio-Rad IQ5».

Результаты. Разработка количественной ПЦР для определения вируса ИРТ была разделена на следующие этапы:

Анализ генома вируса и подбор праймеров

Синтез праймеров и проверка их специфичности.

Оптимизация условий проведения ПЦР.

Получение положительного контроля и определение его концентрации.

Получение и тестирование зонда. Оптимизация его концентрации для ПЦР.

Тестирование разработанного метода на разведениях вируса и определение его чувствительности.

Для анализа генома вируса ИРТ были получены нуклеотидные последовательности штаммов Cooper, LD 15, LD 30/2, LD 50/2, BH53, BH81, A7, IBR6813, IBR2113 из международного банка нуклеотидных последовательностей (GenBank). С помощью программы «AlleleID» v6.0 были получены несколько пар праймеров. Путем анализа была выбрана пара gBR и gBF как наиболее специфичная для всех проанализированных штаммов.

Специфичность праймеров была подтверждена проведением обычной ПЦР со штаммами КМИЭВ-6 (БелНИИЭВ) и ТК-А. При этом на геле были четко видны полосы на уровне 85 пар нуклеотидов.

На следующем этапе были проанализированы существующие методики количественной ПЦР. Выбор был сделан в пользу использования SYBR GREEN и технологии «молекулярных маячков» («*molecular beacons*»). Данные методики обладают всеми преимуществами ПЦР в режиме реального времени, однако имеют существенные отличия. Так, SYBR GREEN – это интеркалирующий краситель, который при связывании с двухцепочечной ДНК значительно увеличивает уровень флюоресценции (примерно в 1000 раз) при сравнении со свободным состоянием. Его недостатком является неспецифичность. Краситель связывается с любой двухцепочечной ДНК, таким образом, невозможно определить, образуется требуемый специфичный продукт или же это результат образования неспецифичных продуктов амплификации. В данном методе возможно использование анализа кривой плавления продуктов амплификации. Суть анализа заключается в том, что зная искомую последовательность нуклеотидов, можно предсказать температуру плавления продуктов амплификации и проводя посте-

пенное повышение температуры на графике в точке плавления продукта будет видно значительное падение уровня флюоресценции. Если температура плавления специфичного продукта совпадает с температурой пика падения уровня флюоресценции, то считается, что проба положительна. Однако существует вероятность наличия неспецифичного продукта с такой же температурой плавления. Зонд, сконструированный по технологии molecular beacon, не имеет данного недостатка. Он представляет собой олигонуклеотид с комплементарными участками начала и конца и имеющимися на них флюоресцентной меткой и тушителем флюоресценции. Зонд имеет два энергетически выгодных состояния. В свободном состоянии начало и конец сомкнуты, флюоресцентная метка и тушитель флюоресценции находятся на близком расстоянии, соответственно флюоресценция отсутствует. При наличии комплементарного участка одноцепочечной ДНК происходит связывание зонда, при этом он раскрывается, флюоресцентная метка и тушитель расходятся на расстояние и регистрируется увеличение флюоресценции. Благодаря связыванию зонда только с комплементарным участком ДНК данная методика является высокоспецифичной.

Для оптимизации условий ПЦР использовали SYBR GREEN. Первоначально определили оптимальную концентрацию праймеров для наибольшей чувствительности ПЦР. Для этого подготовили 4 разведения пар праймеров с концентрациями 10, 5, 2,5 и 1,25 пмоль/мл. Реакцию проводили в 20 мкл ПЦР смеси, содержащей по 1мкл праймеров gBR и gBF, 10 мкл 2x премикса IQ SYBR Green (Bio-Rad, США), 3 мкл деионизированной воды и 5 мкл ДНК. Температурный режим реакции состоял из 5 мин первоначального прогрева при температуре 95°C, далее 40 циклов, состоящих из 30 сек денатурации при 95°C, 15 сек отжига при 55°C, 30 сек элонгации при 72°C. Снятие показателей флуоресценции проводилось после стадии элонгации. Для подтверждения специфичности продуктов проводился анализ кривой плавления. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Результаты ПЦР при оптимизации концентрации праймеров

№ образца	Концентрация праймеров (пмоль/мл)	Значение порогового цикла (C _t)
1	10	36,57
2	5	33,82
3	2,5	35,77
4	1,25	-

Таким образом, наиболее эффективной концентрацией праймеров является 5 пмоль/мл.

Далее определили оптимальную температуру отжига праймеров. Для этого использовали те же условия, что и в предыдущем эксперименте, с отличием в использовании праймеров с концентрацией 5 пмоль/мл и различной температурой отжига. Прибор «Bio-Rad IQ5»(США) позволяет в одном эксперименте использовать различную температуру в каждом горизонтальном ряду планшета. Был задан градиент температур от 50°C до 60°C. Наилучший результат амплификации был при температурах отжига от 52°C до 54°C, при этих значениях конечный уровень флуоресценции был выше(рис.1, табл.2). Таким образом, ранее теоретически определенная температура отжига 54°C является оптимальной.

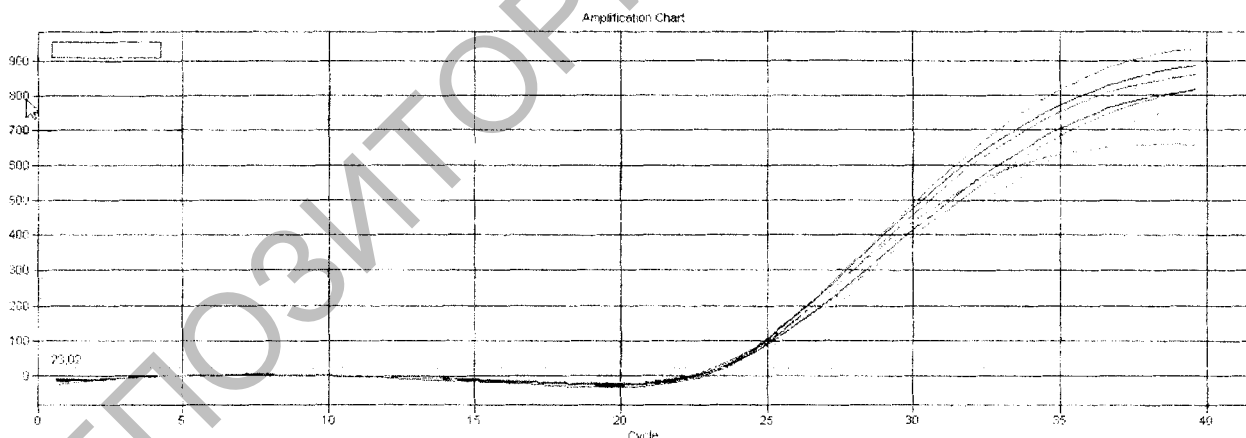


Рисунок 1 — График амплификации при определении оптимальной температуре отжига праймеров

Таблица 2 — Конечные значения флуоресценции амплификации при определении оптимальной температуре отжига праймеров.

№ образца	Значение температуры отжига, °C	Конечное значение флуоресценции, RFU
1	60	725
2	59,5	773
3	58,3	817
4	56,4	781
5	53,9	899
6	52,1	827
7	50,8	848
8	50	653

На основе ДНК штамма КМИЭВ-6 вируса ИРТ получили положительный контроль и определили его концентрацию. После выделения, концентрация ДНК плазмиды длиной 2789 пар оснований составляла 0,385 мкг/мл. Путем расчетов определили, что эта концентрация соответствует 128×10^9 молекул/мл. На основании этих данных подготовили серию десятикратных разведений с концентрацией ДНК от 10^2 до 10^7 копий/мл.

После оптимизации условий проведения ПЦР была проведена работа по созданию и оптимизации использования зонда. На основе ранее полученных праймеров и нуклеотидных последовательностей штаммов вируса ИРТ в программе «AlleleID» v6.0 был создан зонд МВ. Для определения оптимальной температуры гибридизации зонда и ДНК-мишени были проанализированы температурные профили денатурации. При низких температурах в растворе, содержащем зонд и комплементарную ДНК, регистрировался более высокий уровень флуоресценции. При повышении температуры происходила денатурация ДНК и зонда, что сопровождалось снижением уровня флуоресценции. В противоположность этому в растворе, содержащем зонд МВ, наблюдалось увеличение флуоресценции при температуре плавления комплементарных начала и конца, т.е. при 62°C . В температурном диапазоне $50-62^\circ\text{C}$ в пробе, содержащей зонд и комплементарную ДНК, наблюдался значительно больший уровень флуоресценции, что позволяет детектировать продукты ПЦР. Таким образом, температура 54°C (оптимальная для отжига праймеров) также является оптимальной для детекции продуктов амплификации зондом МВ.

Для возможности количественного определения ДНК возбудителя ИРТ необходимо иметь ряд разведений положительного контроля с заранее известной концентрацией, на основании которых строится калибровочная кривая и определяется концентрация вируса в неизвестных образцах. Ранее полученные разведения положительного контроля показали хорошие результаты с использованием красителя SYBR Green. Для определения возможности использования этих контролей с зондом МВ была поставлена ПЦР со следующими условиями: 5 мин первоначального прогревания при температуре 95°C , далее 40 циклов, состоящих из 30 сек денатурации при 95°C , 15 сек отжига при 54°C , 30 сек элонгации при 72°C . Использовали концентрации стандартов от 10^3 до 10^6 . Результаты на рис.2.

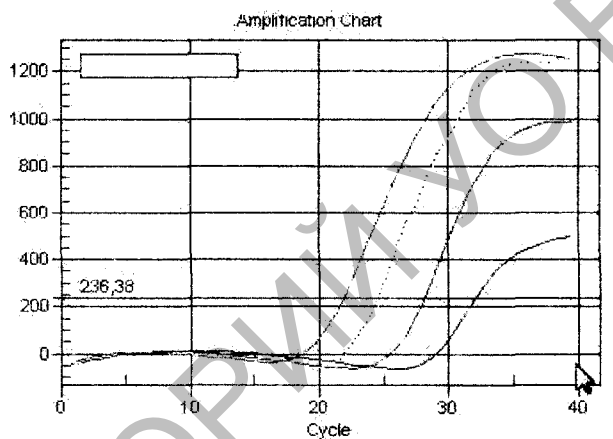


Рисунок 2 — График амплификации при использовании разведений положительного контроля

Тестирование разработанного метода проводили в разведениях штамма КМИЭВ-6 вируса ИРТ. Для этого приготовили 10-и кратные разведения вируса в первоначальной концентрации 7 Ig . Из полученных разведений методом фенольной экстракции была выделена ДНК. С полученными выделениями ДНК была поставлена ПЦР с условиями, аналогичными условиям при калибровке положительных контролей. Для количественного определения вируса в выделениях в реакции использовались 4 стандарта (положительных контроля) с концентрацией от 10^3 до 10^6 . Результаты представлены на рисунке 3 и в таблице 3.

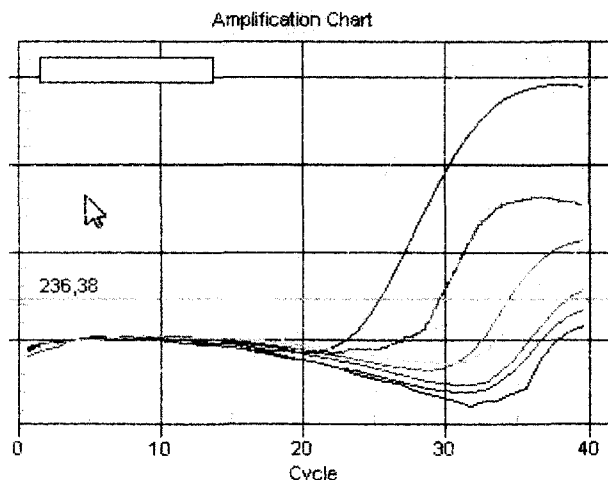


Рисунок 3 — График амплификации разведений вируса с концентрацией от 1 Ig до 7 Ig (амплификация положительных контролей не отражена)

Таблица 3 — Результаты амплификации разведений вируса

№ п/п	Наименование образца	Пороговый цикл, (Ct)	Начальное количество, копий/ образец
1	развед. вируса 7 Lg	21,52	1,102E+06
2	развед. вируса 6 Lg	25,39	7,737E+04
3	развед. вируса 5 Lg	29,93	2,807E+03
4	развед. вируса 4 Lg	34,48	1,489E+02
5	развед. вируса 3 Lg	38,58	8,826E+00
6	развед. вируса 2 Lg	39,78	2,226E+00
7	развед. вируса 1 Lg	-	0,000E+00
8	Положит. контроль	31,98	1,000E+03
9	Положит. контроль	28,07	1,000E+04
10	Положит. контроль	24,78	1,000E+05
11	Положит. контроль	21,92	1,000E+06

Из таблицы видно, что чувствительность данного метода позволяет определить в образце наличие вируса с концентрацией 2 lg, что соответствует 2 копиям ДНК.

Заключение. В настоящее время интенсивное ведение животноводства требует более быстрых и совершенных методов не только диагностики заболеваний, но и контроля биопрепаратов. Получившие в последнее время развитие и совершенствование методики полимеразной цепной реакции позволяют более быстро справляться с задачами, решаемыми традиционными методами. Кроме того, точность и чувствительность ПЦР превосходят традиционные методы. Определяя прямое наличие возбудителя в пробах, снижаем вероятность получения ложноотрицательных результатов по сравнению с изучением результатов жизнедеятельности микроорганизмов.

Разработанная методика позволяет быстро определять не только наличие вируса ИРТ, но и его первоначальное количество в пробе. Благодаря использованию зонда МВ, построенного по технологии «molecular beacon», данный метод является высокоспецифичным. Это связано с тем, что флуоресценция регистрируется только когда зонд связывается с комплементарным участком ДНК, в противном случае результат будет отрицательным. Чувствительность данной методики позволяет определить в образце наличие вируса с концентрацией 2 lg, что соответствует 2 копиям ДНК.

Литература. 1. Глотов А.Г. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, А.Ф. Шуляк, Т.И. Глотова и др. // РАСХН, Сиб. отд-ние, ГНУ ИЗВСиДВ. – Новосибирск, 2006. – 196 с. 2. Говорун В.М. Новые направления в ДНК-диагностике / В.М. Говорун // Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний: Материалы 2-й Всероссийской науч.-практ. конф. (Москва, 20-22 января 1998г.). – Москва, 1998. – С. 12-13. 3. Гусева Е.В. Применение ПЦР в диагностике инфекционных болезней сельскохозяйственных животных / Е.В. Гусева, Т.А. Сатина, Т.А. Фомина // Науч. основы технологии пром. производства вет. биол. препаратов. Тез. докл. 5-й Всероссийской конф. (Щелково, 14-17 мая). – Щелково, 1996. – С. 38 – 40. 4. Инфекционная патология животных: в 2 т/Под ред. А.Я. Самуйленко, Е.В. Соловьева, Е.А. Непоклюнова, Г.С. Воронина – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т.1 – 2006. – 911 с. 5. Belak S. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology / S. Belak, A. Ballagi-Pordany // Vet. Res. Commun. - 1993. - Vol. 17. - P. 55-72. 6. Bitsch V. Persistence of infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in Danish cattle herds / V. Bitsch // Nord. Veter. Med. – 1978. – Vol. 30, № 4 - 5. - P. 178 – 185. 7. Chen W. Molecular Beacons: A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detecting Salmonella / W. Chen, G. Martinez, A. Mulchandani // Analytical Biochemistry - Vol.280, P. 166–172. 8. Engels M. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis / M. Engels, F. Steck, R. Wyler // Arch. Virol. – 1981. – Vol. 67, №2. P. – 169 – 174. 9. Gupta P.K. Cloning and expression of bovine herpesvirus – 1 glycoprotein C / P.K. Gupta, M. Saini, L.K. Gupta et al. // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1999. – Vol.47 (№2). – P. 275-282. 10. Roizman B. Family Herpesviridae. / B. Roizman, R.S. Desrosier, B. Fleckenstein / In: Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A. and Summers M.d. (Editors), Virus Taxonomy, 6th Rep. Of the Int. Committee on Taxonomy of viruses. Arch. Virol., Suppl. 10, Springer-Verlag, Wien, New-York, 1995. - P. 114 - 127. 11. Vet J. Design and Optimization of Molecular Beacon Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays / J. Vet. S. Marras // Methods in Molecular Biology, 2004. – Vol.288, P. 273-290.

УДК 619:579

ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ ИЗ ВОДНОЙ СРЕДЫ

Медведев А.П., Билецкий О.Р., Грибанова М.В., Кошнерова Л.А.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

Предложена среда обогащения для изоляции сальмонелл из водной среды, которая проста в изготовлении и эффективнее традиционных сред, применяемых для этой цели.