

массы тела 1 раз в сутки в течение 10 дней перед отелом позволило снизить заболеваемость репродуктивных органов у коров на 55,3% и сократить на 75 дней срок бесплодия по сравнению с контрольными животными.

*Литература.* 1. Еремин, С. П. *Повышение эффективности ведения скотоводства [Текст] / С. П. Еремин, П. И. Блохин, Г. Д. Комарова, О. В. Руденко // Ветеринарная медицина. – 2012. – № 1. – С. 12-13.* 2. Шабунин, С. В. *Болезни органов размножения у животных как локальное проявление полиорганной патологии [Текст] / С. В. Шабунин, А. Г. Нежданов // Современные проблемы ветеринарного обеспечения репродуктивного здоровья животных : Матер. междунар. научн.-практ. конф., посвящ. 100-летию В. А. Акатова 27-29 мая 2009 года. – Воронеж, 27 - 29 мая 2009. – С. 6 - 9.*

УДК 579.864

## ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ИЗ КУЛЬТУРЫ ЛЕПТОСПИР

Ермагамбетова С.Е., Бияшев К.Б., Бияшев Б.К., Киркимбаева Ж.С.,  
Сарыбаева Д.А.

*НАО «Казахский национальный аграрный университет»,  
г. Алматы, Республика Казахстан*

**Введение.** Создание стабильного благополучия территории Республики Казахстан по инфекционным болезням и обеспечение биологической безопасности является важной задачей для улучшения социально-экономической обстановки и укрепления национальной безопасности.

Успешная борьба с любым инфекционным заболеванием возможна при правильно разработанном комплексе мероприятий, включающем в себя своевременную и эффективную диагностику, специфическую профилактику и разработку мер по оздоровлению хозяйств от различных заболеваний, в том числе от лептоспироза. Лептоспироз является инфекционным заболеванием многих видов животных, птиц и человека. Наши исследования свидетельствуют, что в последние годы лептоспироз протекает в бессимптомной форме, а переболевшие животные надолго остаются лептоспиноносителями. Клиническая форма болезни с симптомами иктерогемоглобинурии, или аборт, проявляется у небольшой группы животных. Тогда как инфицированные животные, имеющие антитела, но без клинического проявления болезни, являются основным источником возбудителя инфекции для здоровых животных и человека. Возникновение заболевания людей лептоспирозом связано с наличием эпизоотических очагов лептоспироза у животных.

В нашей республике производственный выпуск диагностических препаратов и тест-систем не налажен, на практике единственно узаконенной остается реакция микроагглютинации и лизиса, недостатком которого является то, что для проведения тестов требуется наличие большого количества набора живых возбудителей лептоспироза, которые нуждаются в постоянной поддержке (пересевы через каждые 7 дней), что небезопасно для лабораторных работников. Кроме того, проведение исследований требует больших трудозатрат, обусловленных необходимостью при первичной диагностике лептоспироза постановки серологических реакций с каждым штаммом.

Более перспективным в этом направлении представляется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на амплификации *in vitro* специфических последовательностей ДНК и отличающийся высокой чувствительностью и специфичностью. Преимуществом этого метода является также возможность диагностики заболевания на ранних стадиях развития, в инкубационном периоде и при течении в скрытой, нетипичной форме.

Разработка тест-системы, позволяющей выявлять ДНК всех патогенных лептоспир вида *L.interrogans*, будет основанием для проведения испытаний не только в клинической, но и в ветеринарной практике, в том числе для прижизненного контроля животных на лептоспириносительство и для индикации лептоспир в продуктах животного происхождения.

Целью и задачей исследования явилась разработка тест-системы, позволяющей выявлять ДНК всех патогенных лептоспир вида *L.interrogans*.

**Материалы и методы исследований.** Объектом исследования явились 8 штаммов лептоспир (*L. pomona*, *L. tarassovi*, *L. grippotyphosa*, *L. hebdomonas*, *L. serjoe*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. australis*), используемых для идентификации возбудителей инфекционных болезней на основе выявления их генетического материала в пробах. Штаммы депонированы в Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (РГП КН МО и Н РК).

Морфологические свойства лептоспир изучались путем микрофотографирования препаратов «раздавленная капля» в темном поле микроскопа. Для этого нами использованы современные микроскопы Levenchuk МТ 42002 с темнопольным фильтром для конденсора, Levenchuk Д870Т, микроскоп LEICA DM 4000 В.

В качестве биологической модели для очистки культур лептоспир использовались морские свинки, которым внутрибрюшинно вводили контаминирующую культуру. Затем кровь из сердца зараженных животных засеивали на жидкие питательные среды.

**Результаты и обсуждение.** При диагностике лептоспироза животных методом ПЦР основным рабочим материалом является ДНК бактерий [5, 2]. Основным критерием в методах выделения ДНК является высокая степень очистки нуклеиновой кислоты от примесей клеточных ДНК и белков. Выделенная геномная ДНК должна быть нефрагментированной, так как она служит матрицей для синтеза специфического продукта [1, 3]. Поэтому нами проведены исследования по отработке оптимальных методов экстрагирования бактериальной ДНК.

Процедура выделения ДНК из клеток и тканей часто является исходным (основным) этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне. От ДНК напрямую или через белки-ферменты зависят все биосинтезы и катаболизм клетки. Клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а хромосомную ДНК очистить от других клеточных компонентов. Прежде всего, нужно отделить ДНК от белков, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов хроматина. При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и максимально сохранить ее целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются [4].

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы:

1. лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом);
2. ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизация клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа;
3. центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл. Затем ДНК осаждают из раствора этанолом и после центрифугирования растворяют осадок в буферном растворе. Вместе с ДНК частично выделяется и РНК, от которой избавляются с помощью фермента РНКазы.

В работе использовали музейные штаммы лептоспир из «исторической» коллекции лаборатории противобактериозной биотехнологии: *L.pomona*, *L.icterohaemorrhagiae*, *L.tarassovi*, *L.canicola*, *L.hebdomadis*, *L.australlis*, *L.grippotyphosa*. Лептоспиры культивировали в водно-сывороточной среде при температуре 28°C.

Для выбора оптимального варианта в работе использовали несколько методов выделения ДНК:

- выделение ДНК с помощью лизостафина;
- выделение ДНК с помощью сорбентов;

- способ выделения ДНК, основанный на использовании буферных растворов, содержащих высокие концентрации солей-хаотропов типа гуанидинтиоцианата;

- выделение ДНК из культуры лептоспир с помощью автоматической станции выделения нуклеиновых кислот – Thermo Scientific King Fisher;

- выделение ДНК из бактериальной культуры лептоспир проводили обработкой протеолитическим ферментом – протеиназой К;

- выделение ДНК из клеток лептоспир с помощью тритона X-100, разработанного сотрудниками лаборатории протробактериозной биотехнологии КазНАУ.

Главными критериями при отработке оптимальных методов были концентрация и чистота препарата.

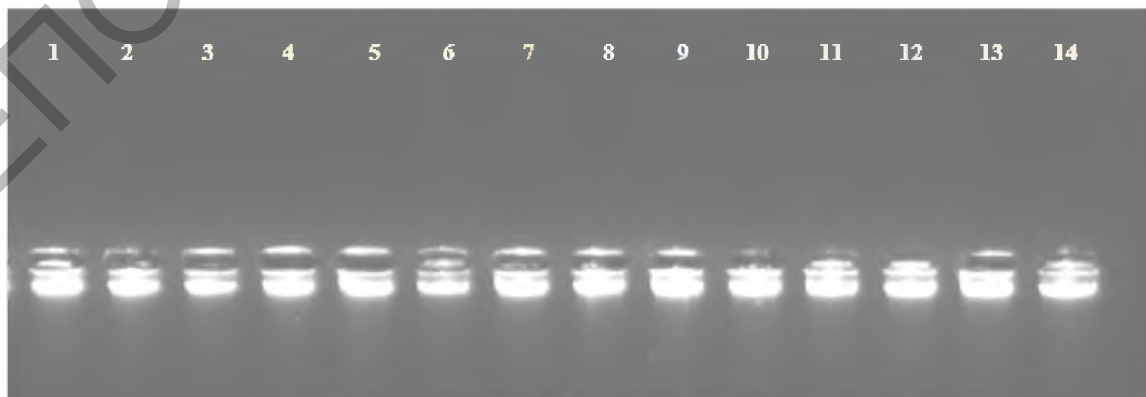
После выделения ДНК из клеток лептоспир вышеперечисленными методами проводили качественный и количественный анализ образца. Электрофорез проводили в 0,8% агарозном геле в ТАЕ-буфере. Спектрофотометрически измеряли отношение между оптическими плотностями при 260 и 280 нм. Максимум поглощения для нуклеиновых кислот регистрируется при длине волны 260 нм. Препарат ДНК считается свободным от примесей при величине отношений  $E_{260/280}$ , равной 1,8 и выше. Если этот показатель ниже указанного, то образец загрязнен белками или фенолом.

Образцы ДНК из клеток лептоспир, полученные с использованием детергентов лизостафина и сорбента, оказались невысокого качества. Отношения между оптической плотностью при длинах волн 260 и 280 нм в среднем составляли 1,65-1,7, что говорило о загрязненности ДНК белком и другими примесями.

Лучшие результаты были получены при обработке бактериосодержащей суспензии детергентом – 10% раствором додецилсульфата натрия в сочетании с протеиназой К и с последующей экстракцией фенол/хлороформом. Применение додецилсульфата натрия не только депротенизирует бактериальную клетку, но также подавляет активность нуклеаз. Клеточные белки удаляли обработкой протеолитическим ферментом – протеиназой К. Для удаления белков и разрыва связей ДНК-белок использовали смесь фенол-хлороформ, которая является более сильным средством депротенизации. Отношение оптической плотности ( $E_{260}/E_{280}$ ) полученных препаратов ДНК лептоспир имело среднее значение  $1,820 \pm 0,02$ .

Хорошие результаты дает использование автоматической станции выделения НК – Thermo Scientific King Fisher. Отношение оптической плотности ( $E_{260}/E_{280}$ ) полученных препаратов ДНК лептоспир имело среднее значение  $1,75 \pm 0,05$ .

Лучшие результаты были получены при использовании метода выделения ДНК из клеток лептоспир с помощью тритона X-100. Отношение оптической плотности ( $E_{260}/E_{280}$ ) полученных препаратов ДНК *Leptospira interrogans* имело среднее значение  $1,91 \pm 0,03$  ( $n=4$ ).



**Рисунок 1 - Результаты ПЦР-анализа исследуемого штамма**

Дорожки представляют собой образцы ДНК, выделенные из разных штаммов лептоспир. Дорожки с 1 по 7 - ДНК лептоспир, выделенные набором: Thermo

Scientific King Fisher, с 8 по 14 - ДНК из клеток лептоспир, выделенные с помощью тритона X-100, разработанного сотрудниками лаборатории протвобактериозной биотехнологии КазНАУ.

**Выводы.** Результаты качественного и количественного анализа показали, что при выделении ДНК из клеток лептоспир хорошие результаты дают использование автоматической станции выделения НК – Thermo Scientific King Fisher, метод обработки бактериосодержащей суспензии детергентом – 10% раствором додецилсульфата натрия в сочетании с протеиназой К, а также метод выделения ДНК из клеток лептоспир с помощью тритона X-100. Способы позволяют получить высокоочищенную хромосомную ДНК из клеток лептоспир в препаративном количестве, пригодную для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) и для клонирования.

*Литература.* Hernandez-Rodriguez P., C. A. Diaz, E. A. Dalmau, G. M. Quintero. 2011, A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *J. Microbiol Met.*, 2011.- 84:1-7. 2. Vijayachari P., Sugunan A.P. Shriram A.N. Leptospirosis: an emerging global public health problem // *J. Biosci.* -2008. 33(4).- 557–569. 3. Киркимбаева Ж.С. Иммунопрофилактика лептоспироза сельскохозяйственных животных и пушных зверей: автореф. дисс. докт. вет. наук. –Алматы. -2004. -45с. 4. Малахов Ю.А., Панин А.Н., Соболева Г.Л. Лептоспироз сельскохозяйственных животных. - Москва, 2000. – 420 с. 5. Павленко А.Л. Особенности эпидемиологии лептоспироза на современном этапе// *Симферополь, Запорожский медицинский журнал.*- 2013. №6.- С. 63-69.

УДК 612.62:612.017.11

## СОСТОЯНИЕ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ПРОТИВОМИКРОБНОГО ПОТЕНЦИАЛА ФАГОЦИТОВ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ У КОШЕК

**Желавский Н.Н., Шунин И.Н.**

*Подольский государственный аграрно-технический университет,  
г. Каменец-Подольский, Хмельницкая область, Украина*

**Введение.** Система иммунной защиты животных сформировалась в процессе длительного эволюционного развития [1, 2]. Со дня открытия феномена фагоцитоза И.И. Мечниковым уже прошло более века. Невзирая на это, ученые разных стран мира продолжают проводить всестороннее исследование клеточных факторов защиты иммунной защиты и изучение взаимодействия иммунокомпетентных клеток [3-5].

Система локальной иммунной защиты органов размножения животных имеет сложное онтогенетическое развитие, которое четко подчинено генетической детерминации и нейрогуморальным механизмам регуляции [6-9]. В современных научных изданиях все больше появляется данных о роли фагоцитов в индукции цитокинов, синтеза пептидов, медиаторов и других биологически активных веществ, которые принимают роль как при формировании иммунного гомеостаза, так и в запуске каскада воспалительной реакции [3, 5, 8, 10]. На сегодняшний день центральным объектом исследований являются механизмы реализации противомикробной защиты фагоцитарных клеток (эксекреция противомикробных соединений, формирование защитных ловушек и др.), а также изучение факторов регуляции функционального состояния фагоцитов [5, 8, 11, 12].

По данным многих исследователей возникновение и развитие репродуктивной патологии (вагинит, эндометрит, пиометра) часто возникают на фоне иммунологических нарушений [3, 7, 12, 15].

В связи с актуальностью проблемы целью нашей работы было исследовать функциональное состояние фагоцитарных клеток, а также изучить и интерпретировать роль их противомикробного потенциала в формировании гомеостаза в системе