

34. Tetteh, K. K. A., Loukas, A., Tripp, C., Maizels, R. M. Identification of abundantly-expressed novel and conserved genes from infective stage larvae of *Toxocara canis* by an expressed sequence tag strategy. // Infect. Immun., 1999. — 67. — P. 4771-4779.
35. Vercruysse, J., Gabriel, S. Immunity to schistosomiasis in animals: an update. // Parasite Immunology 27 (7-8). — 2005. — P. 289-295.
36. Zaccane, P., Fehervari, Z., Phillips, J. M., Dunne, D. W., Cooke, A. Parasitic worms and inflammatory diseases // Parasite Immunology 28 (10). — 2006. — P. 515-523.

IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF INTERACTION BETWEEN PARASITIC HELMINTHES AND HOST ORGANISM

Mazurkevich A. I., Kuts N. V., Kovbasa D. V.

National Agrarian University, Kyiv

There is a review of works, which are dealing with the characteristic of some helminth-derived substances with their relation to possible influence on host immune system functioning. Cytokine homologues, proteases inhibitors, C-type lectins, calreticulin, neutrophilous inhibitory factor, some enzymes and morphine are among such substances.

УДК 619:616.98:578.825.15 - 076

АНАЛИЗ ГЕНОМА ВИРУСА ИРТ И ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ К ВЫСОКОНСЕРВАТИВНЫМ УЧАСТКАМ ДНК

Максимович В. В., д-р вет. наук, проф.

Красочко П. П., асп.

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

Квач С. В., канд. биол. наук

ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

Шманай В. В., канд. хим. наук

ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси», г. Минск,
Республика Беларусь

В современных условиях в патологии животных вирусные инфекции занимают одно из ведущих мест. Особое место занимает инфекционный ринотрахеит (ИРТ). Проведенные нами серологические исследования крови невакцинированных животных с целью изучения распространения инфекционного ринотрахеита показали, что противовирусные антитела выявляются в среднем у 30,7% обследованных животных, что свидетельствует о высокой степени инфицированности животных вирусом [8]. Особенностью данного вируса является его длительная персистенция в организме животных после переболевания и выделение с различными секретами (носовыми истечениями, слезами, спермой, молоком и т.д.). Такие животные являются потенциальным источником распространения заболевания [1].

Для диагностики ИРТ наиболее перспективным 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;

— возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций [4, 5, 7, 9, 10].

Целью настоящих исследований являлся анализ генома вируса ИРТ для подбора праймеров к высоконсервативным участкам ДНК.

Материалы и методы. В работе были использованы: вакцинные штаммы вируса инфекционного ринотрахета крупного рогатого скота КМИЭВ-6, вакцинные штаммы вируса болезни Ауески свиней, ринопневмонии лошадей, ларинготрахета кур, герпесвирус индеек.

Получение нуклеиновой кислоты вируса проводили с помощью набора для выделения ДНК, разработанный сотрудниками ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси». Принцип метода основан на способности хоотропных солей связываться с молекулами ДНК и адсорбировать их на своей поверхности. Для этого предварительно пробы подвергают взаимодействию с лизирующим буфером (протеолитическим ферментом), после чего вносится сорбент, на который сорбируется ДНК. После взаимодействия полученного раствора и сорбента, комплекс ДНК-сорбент несколько раз промывается буферным раствором и просушивается. Далее вносится буфер для элюции, в результате чего происходит разрушение комплекса и перехода ДНК в раствор. После встряхивания и заключительного центрифугирования, супернатант, в котором находится извлекаемая ДНК, переносится в чистую пробирку [2, 6, 11].

Постановка ПЦР проводилась в термоциклере «Eppendorf Mastercycler Personal» (США) по нижеприведенной программе. Первый цикл состоял из первоначальной денатурации при 94°C в течение 2 мин. Далее проводили 35 циклов по схеме: денатурация при 94°C — 30 сек, отжиг праймеров при 55°C — 30 сек, элонгация при 72°C — 30 сек. После последнего цикла смесь в термоциклере прогревается при 72°C в течение 2 мин для прохождения заключительной элонгации.

Учет результатов проводился путем разгонки продуктов амплификации в 1,5% агарозном геле (Serva) [6, 9, 11]

Результаты исследований. Геном вируса представлен двуспиральной молекулой ДНК размером около 136 пар килобаз. Молекула ДНК в свою очередь состоит из длинного уникального сегмента U_L (около 100 килобаз), внутренних повторов IR (11 килобаз), короткого уникального сегмента U_S (13 килобаз) и терминальных повторностей TR. Повторности пространственно ориентированы в соответствии друг к другу. Сегмент U_S располагается между IR и TR, направляется в двух альтернативных направлениях к U_L . Так, ДНК, выделенная из вирионов, представляется в двух изомерических формах в неравных эквимольных количествах. Два изомера обозначены как прототипный (Р) и инверсионный тип сегмента U_S /4/. Ничего пока не известно о возможной функции этого подвижного механизма, хотя в отличие от U_S региона ориентация U_L региона фиксирована.

При помощи секвенирования было выявлено 67 уникальных генов и два гена, дублированных в инвертированных повторах. Большинство генов вируса проявляют гомологию с генами вируса простого герпеса человека (HSV-1) и встречаются в том же порядке. Около 20 протеинов ВНВ-1 были обследованы физическими методами, а функции других белков были выведены из гомологии последовательностей, кодирующих известные протеины других герпесвирусов (табл.1).

Таблица 1 - Протеины, специфичные BHV-1 (по M. Schwyzer et al., 1996).

Функция	Название
Гликопротеин	gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK, gM
Оболочка	UL20, UL34, UL43, UL49.5
Тегумент	UL11, UL36, UL37, UL41 (изолированные белки вириона), UL46, UL47, UL48 (альфа-транс-индуцирующий фактор), UL49, US9
Капсид	UL18, UL19 (мажорный капсидный белок), UL26/26.5 (сывороточная протеаза и ее субстрат), UL35, UL38
Только вирион	UL4, UL21, UL24
Расщепление / упаковывание	UL6, UL15, UL25, UL28, UL32, UL33
Репликация ДНК	UL29 (большая ДНК, связанная с белком), UL30, UL42 (ДНК полимеразы и добавочный белок), UL5, UL8, UL52 (хеликазы/праймазы), LJL9 (оригинальный связывающий белок)
Фермент	LJL23 (тимидинкиназа), UL39, UL40 (субъединицы 1 и 2 рибонуклеотидной редуктазы), UL2 (урацил-ДНК-гликозилаза), UL50 (dUTPase), UL13, US3 (протеин киназа), UL12 (ДНКаза)
Регуляторная	BICP0, BICP4, BICP22, BICP27
Неизвестная	UL3, UL7, UL14, UL16, UL17, UL31, UL51, US2
BHV-1 Специфичность	UL0.5, UL3.5, circ, UL1.5

Геном BHV-1 содержит, по крайней мере, 10 генов с потенциальной способностью кодировать гликопротеины. Эти сложные белки играют важную роль в инфекционном процессе и иммунном ответе. Локализуясь на оболочке вириона и на поверхности инфицированных клеток, они представляют собой важные мишени для иммунной системы инфицированного организма. Также они служат медиаторами внедрения вириона в клетку-хозяина, слияния и распространения вируса от клетки к клетке. Основные свойства и функции гликопротеинов BHV-1 представлены в таблице 2.

Исследования по подбору праймеров генома вируса ИРТ проводили в 5 этапов. На первом этапе проведен анализ генома вируса ИРТ на основе литературных данных (на примере полного генома штамма Cooper). На втором этапе были установлены высоко консервативные участки генома вируса, к которым подбирались олигонуклеотидные затравки. На третьем этапе проведен синтез характерных олигонуклеотидных последовательностей вируса ИРТ. На четвертом этапе проведен выбор наиболее специфичного праймера вируса ИРТ в отношении вакцинных штаммов вируса (КМИЭВ-6). На пятом этапе проверена специфичность праймера вируса ИРТ в отношении близкородственных герпес-вирусов сельскохозяйственных животных и птиц.

На основании вышеизложенного, нами были установлены высоко консервативные участки генома вируса, к которым подбирались олигонуклеотидные затравки. Данные участки кодируют необходимые для жизнедеятельности вируса гликопротеины (B, C, D, E) и фермент тимидинкиназу. Праймеры подбирались с помощью программы Vector NTI на основе полного генома штамма Cooper [16, 21, 22]. В таблице 2 приведены последовательности праймеров для каждого участка-мишени.

Таблица 2 - Гликопротеины BHV-1 и их функции (по M. Schwyzer et al., 1996)

Название ^a	Свойства ^b	Функции ^c	Взаимодействия ^c
gB (UL27) (форма gl)	(101 K) вирусная оболочка, N-связанный гликозилированный, высоко иммуногенный	Обязательный (необходимый) для репликации, консервативный; прикрепление, проникновение, распространяется от клетки к клетке, слияние с оболочкой клетки	Гетеродимерная формация с расщепленными собственными фрагментами; связанный с гепаран-подобными рецепторами
gC (UL44) (форма gill)	91K вирусная оболочка, N- и O- связанный гликозилированный, высоко иммуногенный	Необязательный (несущественный) для репликации, вариабельное прикрепление, гемагглютинин (вирулентность)	Связывание с гепаран-подобными рецепторами (для дополнения фактора C3b)
gD (U56) (форма gIV)	71K вирусная оболочка, N- и O- связанный гликозилированный, конформационно чувствительный, высоко иммуногенный	Условно-необходимый для репликации (проникновение, распространение от клетки к клетке), интерферирование может быть комплементарным gH	Приобретает остатки 6-фосфорнокислой маннозы и связывается с рецепторами 6-фосфорнокислой маннозы, отличными от heparan sulfate рецепторов
gE (US8)	92K вирусная оболочка, N- связанный	Необязательный, распространение от клетки к клетке, вирулентность	gl (Fc-рецептор)
gl (US7)	гликозилированный (40K) вирусная оболочка	(способность нвазировать нервную ткань) Необязательный, распространение от клетки к клетке, (вирулентность)	gE (Fc-рецептор)
gL (UL1)	(ПК)	консервативный (проникновение) (транспорт и поддержка gH)	(gH)
gG (US4) (форма gX)	(47K), Секреторный протеогликан	Необязательный (функция неизвестна)	
gK (UL53)	(35K)	Формирование синцития (многоядерная протоплазма, не разделенная на отдельные клетки)	
gM (UL10)	(43K)	Необязательный (распространение в CNS)	
gj (US5)	Не существует у BHV	Необязательный (не влияет на размножение вируса в месте инокуляции или в периферической или центральной нервной системе")	

^a Наименование белков, в скобках прежнее обозначение.

^b В скобках: Молекулярный вес, предсказанный от последовательности нуклеотида.

^c В скобках: Свойства, предложенные на основе гомологии последовательностей с другими вирусами герпеса.

Таблица 3 — Выявленные последовательности праймеров генома вируса ИРТ.

№ п/п	Кодируемый гликопротеин/фермент	Последовательность праймеров
1	Гликопротеин D	Sense (смысловый праймер) GCGAACATGCAAGGGCCGACAT Antisense (антисмысловый праймер) TAATCAGTCCCAGCTCGTCGTCCG
2	Гликопротеин B	Sense (смысловый праймер) GGACAGCGTCGTCATCTACG Antisense (антисмысловый праймер) GAAGAAAGCGCGAGTTTTCCC
3	Гликопротеин C	Sense (смысловый праймер) TAGCCAGTGGCGGTGCAGGTGTAGT Antisense (антисмысловый праймер) TTTCGCGCACGTCCGTCCTTAC
4	Гликопротеин E	Sense (смысловый праймер) CTGCTGCTGCCGACGTTATTGCTTT Antisense (антисмысловый праймер) TACAGGAAGTACACGCCGCCGT
5	Тимидинкиназа	Sense (смысловый праймер) TCTCCGCGTCGTGCGTATCTACCTG Antisense (антисмысловый праймер) TTGATCTCGCGGAGGCAGTAGC

Синтез праймеров проводили на автоматическом синтезаторе олигонуклеотидов «BIOSET ASM 800» (Био-Рад). Принцип работы автомата-синтезатора представляет собой подачу в реактор с помощью насоса (под контролем микропроцессора) защищенных нуклеотидных компонентов, реагентов и растворителей по заданной программе в колонку, содержащую полимерный носитель с закрепленным на нем первым нуклеозидом. После окончания синтеза и отделения полностью защищенного олигонуклеотида от полимерного носителя проводят деблокирование, очистку и анализ синтезированных фрагментов ДНК. Данный метод является наиболее распространенным методом твердофазного синтеза олигонуклеотидов и основан на использовании нуклеотидного компонента, содержащего фосфор(III). В так называемом амидофосфитном-способе нуклеотидным компонентом является эфир 3'-амидофосфита дезоксинуклеозида. Достаточно устойчивые амидофосфиты при протонировании в присутствии тетразола превращаются в сильные фосфорилирующие агенты. Схема также включает блокирование непрореагировавшей 3'-гидроксигруппы достраивающегося олигонуклеотида (кэпирование) и окисление межнуклеотидного фосфита. После завершения синтеза удаляют защитные группы с межнуклеотидных фосфатов, отделяют олигонуклеотид от носителя, деблокируют группы NH, гетероциклов. Липофильную группу (MeO)₂Tg удаляют после первого хроматографического разделения.

После подбора наиболее специфичного праймера проводили амплификацию с выделенной ДНК вируса ИРТ (штаммы КМИЭВ-6), а в качестве положительного контроля использовали эпизоотический штамм «Оренбург». В результате проведенной амплификации и разгонке полученных амликонов в 2% агарозном геле получили четкую полосу на уровне 490 п.н. для праймеров синтезированных к участку генома, кодирующем гликопротеин D.

Таким образом, в результате проведенных исследований была подобрана пара праймеров к участку генома вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, кодирующего гликопротеин D.

Праймеры имели следующие последовательности нуклеотидов:

смысловой – GCGAACATGCAAGGGCCGACAT,
антисмысловой – TAATCAGTCCCAGCTCGTCGTCCG.

Обсуждение результатов. Приведенные данные свидетельствуют о том, что в результате проведенных исследований была подобрана пара праймеров, которая специфически амплифицирует фрагмент генома вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Размер полученного ампликона и его специфичность были подтверждены при помощи элетрофореза и рестрикционного анализа.

Выводы. 1. Получена пара праймеров, подобранных к гену, кодирующем гликопротеин D, для выявления генома вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и доказана их специфичность.

2. Проведенные исследования продемонстрировали близкое генетическое родство вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и вируса ринопневмонии лошадей.

Список литературы

1. Болезни сельскохозяйственных животных / Под ред. / П.А.Красочко Минск, „Бизнесофсет“, 2005. – 800 с.
2. Глотов А.Г. Обнаружение ДНК вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в сперме клинически здоровых быков-производителей методом молекулярной гибридизации / А.Г. Глотов // Методология мероприятий по профилактике и ликвидации болезней сельскохозяйственных животных. – Новосибирск, 1995. – С. 172-177.
3. Глотов А.Г. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, А.Ф. Шуляк, Т.И. Глотова и др. // РАСХН, Сиб. отд-ние, ГНУ ИЭВСиДВ. – Новосибирск, 2006. – 196 с.
4. 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.
5. 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.
6. Морозов И.А. Дифференциация штаммов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота с помощью рестрикционного анализа / И.А. Морозов, А.Ф. Шуляк, С.К. Артюшин и др. // Мол. генет., микробиол. и вирус. – 1991. - №4. – С. 64 – 67.
7. Панин А.Н. Полимеразная цепная реакция – необходимый инструмент для идентификации и типирования возбудителей инфекционных болезней животных / А.Н. Панин, И.Л. Обухов, К.Н. Груздев // Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки в России. Сборник матер. науч. сессии РАСХН (к 100-лет. юбилею ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко). – Москва, 1998. – С. 313 – 315.
8. Красочко П.П. Распространение инфекционного ринотрахеита среди крупного рогатого скота в Республике Беларусь // Материалы конференции молодых ученых. Витебск, 2007. – С.155.
9. 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.
10. Engels M. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infections pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis / M. Engels, F. Steck, R. Wyler // Arch. Virol. – 1981. – Vol. 67, №2. P. – 169 – 174.
11. Fuchs M. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild – type virus and virus lacking glycoprotein E / M. Fuchs, P. Hubert, J. Detterer et al. // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Aug. Vol. 37, №8. – P. 2498 – 2507.

THE ANALYSIS OF THE GENOME OF VIRUS IRT AND SELECTION OF PRIMERS TO HIGHLY CONSERVATIVE REGIONS OF DNA

Maksimovich V. V., Krasochko P. P.

SO "Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine", Vitebsk, Belarus

Kvach S. V.

SSE "Institute of Microbiology of NAS of Belarus", Minsk, Belarus

Shmanay V. V.

SSE "Institute of Physic and Organic Chemistry of NAS of Belarus", Minsk, Belarus

BHV-1 genome characteristic literature was analyzed in this article. There was determined full sequence of virus' genome in 1995. By the use of sequencing there were revealed 67 unique genes and 2 genes that are duplicated in inverted repeats. The most part of genes have homology with genes of human's herpes simplex virus. BHV-1 genome contains at least 10 genes that have potential ability to encode glycoproteins. There were distinguished three temporary phases of virus replication and its gene expression during lytic cycle of infection. Scientists studied and characterized regulator proteins of BHV-1 (BICP0, BICP4, BICP22, BICP27, circ-protein, α -TIF, VP8). Results of design and synthesis of primers for infectious bovine rhinotracheitis were showed.

УДК 619:615.1+615.9 (091)

ДОСВІД І ЗАДАЧІ ВІДДІЛУ ТОКСИКОЛОГІЇ, БЕЗПЕКИ ТА ЯКОСТІ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ ПРОДУКЦІЇ В ННЦ «ІЕКВМ»

Малинін О. О., д-р вет. наук, проф., академік УААН,

Куцан О. Т., д-р вет. наук, чл.-кор. УААН

Шевцова Г. М., канд. вет. наук,

Пашук Ю. Г., канд. вет. наук

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Проблемами токсикології, безпеки та якості сільськогосподарської продукції в ННЦ «ІЕКВМ» займаються понад 85 років. Професор Преображенський А.М. і Тамарін І.Б. були в числі перших, хто заклав в інституті основи ветеринарної фармакології і токсикології. Ними проведені оригінальні дослідження і впроваджені в практику деякі протипаразитарні препарати, вивчені біологічні і лікувально-профілактичні властивості різних фракцій кам'яновугільних масел, розроблена рецептура креолінів для дезінфекції приміщень і лікувально-профілактичних обробок тварин.

У 30 роки, коли інститут називався Українським науково дослідним інститутом експериментальної ветеринарії в ньому діяли відділи санітарії та гігієни, фармакології й хіміотерапії, токсикологічна лабораторія в яких працювали визначні вчені ветеринарної медицини І.Б. Тамарін, професор О.М. Преображенський, М.І. Середа, доктор ветеринарних наук В.О. Фортунний, І.М. Гладенко, майбутній і перший в Україні академік ВАСГНІЛ з ветеринарної медицини, заслужений діяч науки і техніки СРСР.

Протягом 40-50 років в інституті досліджували кормові токсикози, токсикодинаміку креолінів і льняної макухи, створювали препарати для боротьби з коростою, оводами, лишаєм і вивчали їх дію не тільки на шкідників, а й на тварин (І.М. Гладенко та В.О. Фортунний). Гладенко І.М. перший серед ветеринарних фармакологів провів фундаментальні дослідження щодо токсикології хлорорганічних сполук.

У 60 роки під керівництвом І.М. Гладенка проводились дослідження різноманітних пестицидів, які належали до різних класів (хлорорганічних, фосфорорганічних, карбаматів і піретроїдів), розроблялись заходи боротьби з ектопаразитами і кровопаразитарними захворюваннями. З цих років у інституті почали інтенсивно розви-