



003067929

КОТЕНЕВА

СВЕТЛАНА ВЛАДИМИРОВНА

**РАЗРАБОТКА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННОГО
РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

16 00 03 – ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология
с микотоксикологией и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Koteney'.

Новосибирск - 2006

Работа выполнена в ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока

Научный руководитель доктор ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
Глотов Александр Гаврилович

Официальные оппоненты доктор ветеринарных наук,
профессор
Храмцов Виктор Викторович,

кандидат ветеринарных наук,
Аксенов Василий Иванович

Ведущая организация Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)

Защита состоится «18» сентября 2007 г в «10» часов на заседании диссертационного совета Д 006 045 01 в Государственном научном учреждении Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН по адресу 630501, Новосибирская область, Новосибирский район, п Краснообск, СО РАСХН, ИЭВСиДВ

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО РАСХН

Автореферат разослан «21» ноября 2006 г

Ученый секретарь
диссертационного совета



С И Логинов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота (ИРТ КРС) – контагиозное заболевание, вызываемое герпесвирусом КРС 1-го типа. Вирус является одним из этиологических агентов острых респираторных заболеваний молодняка КРС и гинекологической патологии у взрослых животных

ИРТ КРС внесен в список секции В справочника, выпущенного Офисом МЭБ, который включает болезни, способные к передаче и рассматривающиеся как «имеющие socio-экономическую важность и/или важность в здравоохранении внутри стран, а также значение в международной торговле животными или животноводческими продуктами» [[http //www oie int](http://www.oie.int)]

Заболевание регистрируется во всем мире, в том числе России и странах СНГ (А Г. Готов, 1999, О Г Петрова и соавт , 1999, В А Мищенко и соавт , 2001, Н И Закутский, 2002, Н Ю Басова, 2002, К П Юров и соавт , 2003, L A Babiuk et al , 1991; L. Turin et al , 2003, M Engels et al , 2006). Большую роль в эпизоотологии болезни играют латентно инфицированные быки-производители (Г Э. Фарботко и соавт , 1989, J T van Oirschot et al , 1995)

В настоящее время необходима разработка и внедрение в практику простых, высокочувствительных и специфичных методов, выявляющих возбудителя на любой стадии заболевания К ним относятся молекулярная гибридизация и полимеразная цепная реакция (ПЦР) (S Belak et al , 1993)

В ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН разработана тест-система для диагностики ИРТ КРС методом молекулярной гибридизации, показавшая высокую эффективность при проведении скрининговых исследований спермы быков-производителей на наличие в ней вируса. Однако чувствительность ее в некоторых случаях недостаточна, тк составляет 10^4 ТЦД_{50/мл}

ПЦР имеет явные преимущества в скорости и чувствительности по сравнению с традиционными вирусологическими методиками, а при высокой специфичности ее значение для ветеринарной практики возрастает

В литературе имеются сообщения о выявлении ДНК вируса при помощи ПЦР в сперме (А Candido et al , 2000), культуральной жидкости (В Р Greenivasa et al , 1996), полевых изолятах (А Salwa, 1997) В качестве мишеней амплификации использовались гены гликопротеинов (С Ros et al , 1999) и тимидинкиназы (С V Yason et al., 1995) Во всех случаях авторы сообщают о преимуществах ПЦР перед традиционными вирусологическими методиками

На момент начала наших исследований в России законченных разработок в этом направлении не было

Цель и задачи исследований Целью работы являлась разработка ПЦР для диагностики ИРТ КРС и сравнительное изучение ее диагностической эффективности

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи

1 Провести подбор праймеров и оптимальных параметров проведения диагностической ПЦР, определить ее чувствительность и специфичность Тестировать референтные штаммы и изоляты вируса, выделенные от животных на территории РФ и типированные в реакции нейтрализации в культуре клеток,

2 Изучить сравнительную диагностическую эффективность ПЦР с методами выделения вируса в культуре клеток и молекулярной гибридизации, а также в производственных условиях на пробах биологического материала от животных,

3 Изучить степень контаминации вирусом банков спермы, полученной от латентно инфицированных быков-производителей, на головных племпредприятиях Сибири и провести генотипирование выделенных изолятов.

Научная новизна.

1 Впервые в РФ разработана диагностическая ПЦР, использующая в качестве мишени последовательности гена тимидинкиназы вируса ИРТ КРС,

2 Изучена эффективность реакции в сравнении с методами молекулярной гибридизации и выделения вируса в культуре клеток, показана ее высокая диагностическая эффективность в производственных условиях;

3 Впервые методом ПЦР изучена степень контаминации банков спермы, полученной от инфицированных быков-производителей, на племпредприятиях, а также проведено генотипирование выделенных изолятов вируса при помощи ПЦР-ПДРФ анализа с использованием праймеров, комплементарных последовательностям гена гликопротеина В вируса.

Научная новизна подтверждена двумя патентами Российской Федерации

Теоретическая и практическая значимость работы Материалы диссертации использованы при составлении

- Методических рекомендаций «Вирусные заболевания крупного рогатого скота в Сибири и на Урале (Особенности эпизоотологии, клинического проявления, диагностика, меры профилактики и борьбы)», утвержденных Ученым советом ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН (прот. № 1, 12 01 2001) и подсекцией секции инфекционной патологии отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии «Проблемы инфекционной патологии животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» (прот №1, 15 01 2001),

- Методических рекомендаций «Выявление вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции с последующей дифференциацией вакцинного штамма и эпизоотических изолятов», утвержденных Ученым советом ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН (прот № 6, 09 11 2004) и подсекцией секции инфекционной патологии отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии «Проблемы инфекционной патологии животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» (прот №11, 10 11.2004)

Результаты исследований представляют теоретическую и практическую ценность, создают перспективы использования ПЦР не только в диагностике ИРТ КРС, но и в молекулярной эпизоотологии болезни и могут быть использованы для оптимизации противозооотических мероприятий Разработанная

ПЦР может найти широкое применение в практике для диагностики различных форм ИРТ КРС у животных разных половозрастных групп. Особое значение имеет данный метод при исследовании банков спермы быков-производителей.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены на Международной научно-практической конференции (Покров, 2002), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях» (Воронеж, 2002), IV Всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных заболеваний» (Москва, 2002), 6-й Международной научно-практической конференции «Аграрная наука Сибири, Монголии, Казахстана и Башкортостана – сельскому хозяйству» (Новосибирск, 2003), 2-й Международной научно-практической конференции Ставропольского ГАУ (Ставрополь, 2003).

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ (журнал «Ветеринария», сборники научных трудов, патенты РФ).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 110 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, списка литературы, приложения. Работа иллюстрирована 4 рисунками и 12 таблицами. Список литературы включает 209 источников, в том числе 153 зарубежных.

Основные положения, выносимые на защиту

1 Результаты разработки и сравнительной диагностической эффективности полимеразной цепной реакции (ПЦР) при ИРТ КРС

2 Результаты изучения степени контаминации банков спермы, полученной от инфицированных быков на племпредприятиях Сибири, а также генотипирования выделенных изолятов вируса

Автор выражает глубокую благодарность за помощь в выполнении некоторых разделов диссертации сотрудникам лаборатории биотехнологии – диагностический центр ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН Т И Глотовой, А В Нефедченко, Н В Некрасовой

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Работа выполнена в 2000-2006 г на базе лаборатории биотехнологии – диагностический центр ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН, головных племпредприятий Сибири и хозяйствах Новосибирской и Кемеровской областей и Красноярского края

Подбор праймеров. Анализ последовательностей белков и генов депонированных к настоящему времени штаммов вируса проводили с использованием международных баз данных при помощи компьютерных программ PC-gene, Alignment-serves и CLUSTAL

Праймеры для детекции ДНК вируса были синтезированы на район гена тимидинкиназы (ТК), выбор которого обусловлен жизненной важностью этого белка для вирусной репликации и высокой консервативностью его аминокислотных последовательностей.

При выборе праймеров руководствовались общими требованиями к олигонуклеотидным праймерам, используемым в ПЦР (Р Саики и соавт., 1990). Определение последовательностей праймеров проводили по алгоритму выравнивания последовательностей геномной ДНК в программах Alignment Service V 4.0, GENCNER. Расчет вероятных схем спаривания праймеров осуществляли по методу определения оптимальных вторичных структур нуклеиновых кислот с использованием соответствующих энергетических правил по программе «OLIGO».

Праймеры были синтезированы амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U (Biosset Ltd, Новосибирск).

ПЦР проводили на амплификаторе марки «Бис-108». Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 2% - ном агарозном геле в стандартном Трис-ацетатном буфере (рН 8,0) при напряжении 10 В/см. Результаты электрофореза учитывали, просматривая гель в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе «Трансиллюминатор-UVT-1». Положительными считали пробы, дающие полосу фрагмента ДНК, соответствующую 298 п.о. Исследования проводили в трех повторностях.

Штаммы и изоляты вируса. В работе использовали Российские референтные штаммы Оренбург, 4016 (ВГНКИ ветпрепаратов), ТК, ТК-А, ТНЛ, ТНЛ-2, Щ (ВИЭВ), а также М29 и М40 (Венгрия).

Дополнительно тестировали 24 изолята вируса, выделенных от больных животных на территории России в различные годы. Изоляты С-2, Ярославль, КАМ, Б, ВВ, Я99, МС были получены из ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко, а изоляты И₁, К₂, ЛК, П, И₂, К₁, Д, ПВ, М-Т, Л, М, У, ПВ-М, СП, Сб, СК, СЗ выделены в лаборатории биотехнологии-диагностический центр ГНУ ИЭВСидВ в различные годы от больных и инфицированных животных.

Культура клеток. Использовали перевиваемую линию культуры клеток MDBK. Культивирование клеток проводили монослойным способом в матрасах площадью 25 см². Выделение вируса ИРТ КРС в культуре клеток проводили микрометодом согласно стандарту МЭБ (OIE Manual, Manual of Standards// Chapter 2.3.5, 2000).

Определение инфекционной активности вируса. Инфекционный титр вируса определяли путём титрования в культуре клеток MDBK. Результаты учитывали по цитопатическому действию. Величину титра рассчитывали по методу Рида и Менча (1938) и выражали в тканевых цитопатических дозах (ТЦД_{50/мл}).

Выделение ДНК вирусных штаммов и изолятов. По мере получения вирусных препаратов с инфекционной активностью $10^5 - 10^7$ ТЦД_{50/мл} из них выделяли ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции по методике Ма-

ниатис и соавт (1984) Пробы клинических образцов от животных перед выделением ДНК фенольно-хлороформной экстракцией подвергали предварительной обработке

Проверка чувствительности и специфичности ПЦР. Для определения чувствительности разработанной ПЦР в лабораторных условиях контрольный штамм вируса ИРТ КРС Оренбург подвергли титрованию путем десятикратных разведений до конечного (10^{-7}) и амплифицировали в ПЦР

Для проверки специфичности реакции проводили амплификацию ДНК близкородственных герпесвирусов КРС ВHV-2 (штамм М), ВHV-4 (штамм Movar-33/63), ДНК культуры клеток, в которой реплицировали указанные вирусы, а также ДНК аденовируса КРС 1-го типа (штамм BV-10), риновируса КРС 1-го типа (штамм SD-1), полученные из ВНИИВВиМ, вируса болезни Ауески (штамм Арский, ВГНКИ ветпрепаратов)

Молекулярная гибридизация Постановку проводили в соответствии с «Наставлением по применению тест-системы для диагностики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом молекулярной гибридизации», утвержденной Департаментом ветеринарии МСХ и П РФ от 15 08 2001 г №13-7-2/1551

Всего в ПЦР в сравнении с методами выделения вируса в культуре клеток и молекулярной гибридизации исследовали 400 проб биоматериала, полученных от больных и инфицированных вирусом животных. Диагностическую эффективность ПЦР изучали на 4048 пробах биоматериала

Использовали пробы носовых выделений телят, маточных и вагинальных выделений коров, пробы внутренних органов аборт плодов и телят различного возраста. Пробы спермы рабочих и выбракованных быков-производителей получали из хранилищ племпредприятий и хозяйств области. Серии спермы, полученные в течение месяца, объединяли и исследовали как одну пробу. При отборе проб исходили из остатка запасов спермы, хранящейся на племпредприятиях на момент проведения исследований

Типирование изолятов вируса ИРТ КРС с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДФ) проводили в ПЦР с праймерами к области гена ICP18 5 gV вируса (Н В Тикунова и соавт, 2001). Амплифицировали ДНК изолятов вируса, выделенных из спермы быков-производителей, с последующей рестрикцией эндонуклеазами рестрикции HpaI и SacI1

Подробные методики исследований приведены по мере изложения материалов собственных исследований в начале соответствующих подразделов

Математические расчеты. Статистическую обработку проводили общепринятыми методами (И П Ашмарин и соавт, 1962). Для обработки полученных данных использовали программу «Microsoft Excel», входящую в пакет программ «Microsoft Office 7 0»

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Разработка ПЦР для выявления ДНК вируса ИРТ КРС

2.2.1.1. Подбор праймеров для постановки ПЦР

Выбор праймеров осуществляли по последовательности ДНК, представляющей собой нуклеотидный повтор в гене тимидинкиназы штаммов ВНВ-1 1 (6660, 34, Cooper, Jura, P8-2) и ВНВ-1 2 (K22, Q3932, st), депонированных в GenBank

В результате были синтезированы олигонуклеотидные праймеры, комплементарные нуклеотидным последовательностям 404–424 и 701–681 соответственно и фланкирующие последовательность гена тимидинкиназы вируса размером 298 п о

2.2.1.2. Компоненты ПЦР

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала в 25 мкл 2,5 мкл буфера для Taq ДНК-полимеразы (60 mM Tris-HCl (pH 8,5 при 25°C), 1,5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 10 mM 2- меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X-100), 2,5 мкл 2,5 mM dNTP (смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов), 2,5 мкл 50% - ного ДМСО, по 2,5 мкл каждого праймера с концентрацией 2мМ, 1 ед активности термостабильной Taq ДНК-полимеразы, оставшийся объем занимала деионизованная вода

В смесь вносили геномную ДНК в количестве 5 мкл Поверх смеси наслаивали 2 капли минерального масла Все манипуляции по приготовлению реакционной смеси осуществляли на тающем льду

2.2.1.3. Обработка оптимального режима амплификации

При отработке оптимального режима амплификации в основном варьировали температуру отжига с 55° до 65° С

Установили, что вариации температуры отжига значительно влияют на чувствительность реакции Наивысшая чувствительность была достигнута в ПЦР с температурой отжига 64°C Неспецифических связываний праймеров при использовании различных температурных циклов не отмечали.

В результате оптимальный температурный режим для проведения ПЦР состоял из следующих циклов денатурация при 94°C-1 мин, отжиг при 64°C-25 сек, синтез при 72°C-20 сек Далее 40 циклов по схеме денатурация при 94°C-20 сек, отжиг при 64°C-20 сек, синтез при 72°C-20 сек Синтез в последнем цикле при 72°C-2 мин

2.2.2. Определение чувствительности и специфичности ПЦР с праймерами на ген тимидинкиназы

Для определения чувствительности ПЦР в лабораторных условиях контрольный штамм вируса ИРТ КРС «Оренбург» с инфекционным титром 10^5 ТЦД_{50/мл} подвергли титрованию путем десятикратных разведений до конечного разведения 10^{-7} и амплифицировали в ПЦР. Чувствительность данного способа выявления ДНК вируса ИРТ КРС составила 0,1 ТЦД_{50/мл}.

Для определения специфичности ПЦР использовали ДНК герпесвируса КРС 1 типа (штамм Оренбург), герпесвируса КРС 2 типа (штамм М), герпесвируса 4 типа (штамм Movar – 33/63), вируса болезни Ауески (штамм Арский), аденовируса КРС 1 типа (штамм BV – 10), риновируса КРС 1 типа (штамм SD-1) а также ДНК культуры клеток MDBK. По результатам опытов, вышеуказанные препараты ДНК в ПЦР не амплифицировались (таблица 1)

Таблица 1- Оценка специфичности ПЦР

Вирус (штамм)	Амплификация с праймерами на регион tk
Герпесвирус КРС 1 типа (Оренбург)	+
Герпесвирус КРС 2 типа (М)	-
Герпесвирус КРС 4 типа (Movar-33/63)	-
Вирус болезни Ауески (Арский)	-
Аденовирус КРС 1 типа (BV-10)	-
Риновирус КРС 1 типа (SD-1)	-
ДНК культуры клеток MDBK	-

Примечание «+»- положительный результат,
«-»- отрицательный результат

Полученные результаты подтвердили высокую чувствительность и специфичность разработанной ПЦР

2.2.3. Тестирование при помощи ПЦР референтных штаммов и изолятов вируса ИРТ КРС, выделенных на территории РФ и типированных в реакции нейтрализации

Результаты тестирования штаммов и изолятов вируса представлены в таблице 2

Согласно представленным данным, ПЦР выявляет ДНК всех исследованных штаммов и изолятов вируса, выделенных в культуре клеток от больных и инфицированных животных и типированных в реакции нейтрализации. Результаты были сходными во всех повторностях

Таблица 2- Амплификация ДНК штаммов и изолятов вируса ИРТ КРС в ПЦР с праймерами на ген тимидинкиназы

№ п/п	Наименование штаммов (изолятов)	Клиническая форма заболевания, источник выделения	Амплификация в ПЦР
Штаммы			
1	Оренбург	Респираторная, легкие	+
2	4016	респираторная, легкие	+
3	ТК	респираторная, легкие	+
4	ТНЛ	респираторная, легкие	+
5	М-29	респираторная, легкие	+
6	М-40	Генитальная, влагалищные выделения	+
7	ТНЛ-2	респираторная, легкие	+
8	Щапово	респираторная, легкие	+
9	ТК-А	аттенуированный	+
Изоляты			
10-14	СП, СБ, СК, СЗ, МС	Латентная, сперма	+
15-20	И1, С2, П, ВВ, ЛК, К2	Генитальная	+
21-30	Б, Я99, И2, К1, ПВ, МТ, Л, Ярославль, КАМ, Д	Респираторная	+
31	М	Конъюнктивная	+
32-33	У (абортплод), ПВМ	Головной мозг	+

2.2.4. Эффективность ПЦР при выявлении ДНК вируса ИРТ КРС

2.2.4.1. Сравнительная эффективность различных методов выявления вируса ИРТ КРС при исследовании проб биоматериала от животных разных половозрастных групп

Для определения совпадений результатов выявления ДНК вируса ИРТ КРС при помощи трех методов одновременно исследовали 400 проб биоматериала, полученного от больных и инфицированных животных. Пробы делили по категориям от абортплодов, телят, коров и быков-производителей (таблица 3)

Из данных, представленных в таблице 3, видно, что при исследовании 400 проб биоматериала, полученного от больных и инфицированных животных, эффективность ПЦР в среднем составила 28,3%, метода молекулярной гибридизации – 17,3%, а метода выделения вируса в культуре клеток – 16%. Таким образом, ПЦР выявляет в среднем на 11% и 12,3% положительных проб больше, чем молекулярная гибридизация и метод выделения вируса в культуре клеток соответственно.

Таблица 3- Сравнительная эффективность трех методов выявления вируса ИРТ КРС

№ п/п	Половозрастная группа животных	Количество проб	Выявлено положительных проб			Эффективность выявления, %		
			ПЦР	МГ	ВВ	ПЦР	МГ	ВВ
1	Абортыплоды	25	11	7	6	44	28	24
2	Телята	100	25	20	23	25	20	23
3	Коровы	75	25	17	10	33,3	22,7	13,3
4	Быки-производители	200	52	25	25	26	12,5	12,5
5	Суммарное количество проб	400	113	69	64	28,3	17,3	16

Примечание ПЦР- полимеразная цепная реакция,
МГ- молекулярная гибридизация,
ВВ – выделение вируса в культуре клеток

При исследовании биоматериала от абортыплодов ПЦР выявила положительных проб на 16% больше, чем метод молекулярной гибридизации и на 20% больше, чем выделение вируса

ПЦР также была эффективнее метода молекулярной гибридизации и выделения вируса на 5% и 2% соответственно при тестировании биоматериала от телят

В пробах биоматериала от коров при помощи ПЦР выявили на 10,6% больше положительных в сравнении молекулярной гибридизацией и на 20% больше в сравнении с выделением вируса в культуре клеток

В сперме быков-производителей ПЦР выявила на 13,5% больше положительных проб, чем два других метода

Таким образом, эффективность ПЦР выше, чем двух других методов, при исследовании проб биоматериала от абортыплодов, вагинальных и маточных выделений коров и спермы быков-производителей Известно, что данная категория биоматериала часто бывает контаминирована микрофлорой и не пригодна для вирусологических исследований, а сперма обладает токсичностью для культуры клеток

2.2.4.2. Эффективность ПЦР при выявлении ДНК в пробах биоматериала от больных телят

Эффективность разработанной ПЦР изучали в производственных условиях на 4048 пробах биоматериала, полученного от животных разных половозрастных групп

Для определения эффективности реакции при диагностике респираторной формы болезни исследовали 617 проб биоматериала, полученного от телят Пробы биоматериала отбирали от животных непосредственно в хозяйствах при вспышках массовых респираторных болезней, учитывая данные эпизоотологии, особенности клинического проявления заболевания и патологоанатомических изменений внутренних органов Результаты представлены в таблице 4

Таблица 4- Выявление ДНК вируса ИРТ КРС с помощью ПЦР в пробах биоматериала от телят

Наименование биоматериала	Количество проб	Выявлено положительных	% выявления
Легкие	263	85	32,3
Трахея	46	18	39,1
Лимфоузлы	53	5	9,4
Сердце	27	3	11,1
Печень	42	5	11,9
Селезенка	44	10	22,7
Почки	35	6	17,1
Носовая перегородка, слизистая носа	25	11	44
Носовые выделения	63	25	39,7
Головной мозг	19	5	26,3
ИТОГО	617	173	28

В результате исследований эффективность ПЦР составила 28%

ДНК вируса выявляли чаще в пробах легких (32,3%), трахеи (39,1%), носовой перегородки и слизистой носа (44%), носовых выделениях (39,7%) В головном мозге ДНК вируса обнаружили в 26,3% проб

Дополнительно ДНК вируса выявляли в пробах легочных лимфоузлов (9,4%), сердца (11,1%), печени (11,9%), селезенки (22,7%), почек (17,1%) (таблица 4)

Обнаружение ДНК вируса ИРТ КРС в пробах легких, трахеи, слизистой носа, носовых выделениях, легочных лимфоузлов подтверждает результаты многочисленных исследователей

Выявление ДНК вируса в пробах печени, сердца, почек связано, вероятно, с вирусемией

2.2.4.3. Эффективность ПЦР при выявлении ДНК в пробах биоматериала от коров

Следующим этапом проверки эффективности разработанной ПЦР было исследование проб биоматериала, полученного от коров с гинекологической патологией Исследования проводили в хозяйствах, неблагополучных по гинекологическим заболеваниям коров

Таблица 5 - Выявление ДНК вируса ИРТ КРС с помощью ПЦР в пробах биоматериала от коров

Наименование биоматериала	Количество проб	Выявлено положительных	% выявления
Влагалищные выделения	199	73	36,7
Молоко	7	2	28,6
Экссудат и слизистая матки	26	3	11,5
Плацента	16	4	25
ИТОГО	248	82	33,1

При клиническом обследовании больных животных выявляли следующую патологию: острые и хронические метриты и эндометриты, аборт, рождение нежизнеспособного приплода, задержания последа, нарушение полового цикла, яловость, снижение массы тела и удоев во время болезни.

Всего исследовали методом ПЦР 248 проб биоматериала от коров и 50 проб биоматериала от абортплодов.

Из данных таблицы 5 видно, что ПЦР выявила ДНК вируса ИРТ КРС в 33,1% проб биоматериала от коров. ДНК вируса присутствовала в пробах влагалищных выделений (36,7%), молока (28,6%), экссудата и слизистой матки (11,5%), плаценты (25%).

ДНК вируса ИРТ КРС выявили в 44% проб от абортплодов.

Таким образом, ПЦР показала достаточно высокую эффективность при исследовании проб биоматериала от коров и абортплодов и может быть рекомендованной для диагностики половой формы ИРТ КРС.

2.2.4.4. Эффективность ПЦР при выявлении ДНК в сперме быков-производителей

Для определения чувствительности ПЦР использовали замороженную сперму серонегативного быка-производителя, давшую отрицательный результат в течение трех последовательных пассажей в культуре клеток.

Для этого готовили 10-кратные разведения вируса с исходным титром 10^5 ТЦД_{50/мл} от 10^{-1} до 10^{-6} , добавляли равное количество спермы, перемешивали и инкубировали 1 час при 18°C для воспроизведения естественных условий. Далее центрифугировали 10 минут при 5000 об/мин для отделения осадков спермиев и отбирали по 250 мкл супернатанта для выделения ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции (описан в разделе «Материалы и методы»).

Чувствительность ПЦР при исследовании спермы быков-производителей составила 1 ТЦД_{50/мл}.

Всего методом ПЦР исследовали 3133 проб спермы. ДНК вируса ИРТ КРС выявили в 21,3% проб, что свидетельствует о том, что метод может применяться для исследования проб спермы быков-производителей. Метод имеет высокую степень чувствительности и специфичности, время анализа 100 проб с момента их поступления в лабораторию составляет около 48 часов.

2.2.5. Степень контаминации вирусом ИРТ КРС банков спермы на племпредприятиях, установленная с помощью ПЦР

Изучение степени контаминации банков спермы вирусом ИРТ КРС на племпредприятиях весьма актуально и имеет большое значение, прежде всего потому, что играет важную роль в комплексной оценке эпизоотиче-

ской ситуации и может быть использовано в практике при разработке оздоровительно-профилактических мероприятий

В настоящее время на многих племпредприятиях живых быков нет, но для осеменения коров используют банк семени, полученный от них в течение продуктивного периода. По данным различных исследователей (А. Г. Готов, 1998, 1999, О. С. Stroub, 1981, V. Bitsch, 1984, G. Van Schaik, 1998), такой банк может быть контаминирован вирусом ИРТ КРС на 20-30%. Кроме того, происходит постоянное его пополнение от инфицированных рабочих быков.

При изучении распространения заболевания на племпредприятиях №1 и №2 за основу были взяты результаты собственных исследований, проведенных методом ПЦР.

Результаты исследований приведены в таблице 6.

Согласно приведенным данным, ИРТ КРС распространен на двух обследованных головных племпредприятиях Сибири. Уровень контаминации колеблется от 20,8% до 22,1% и составляет в среднем 22%.

Таблица 6- Уровень контаминации вирусом ИРТ КРС банков спермы головных племпредприятий Сибири

Племпредприятие	Исследовано серий спермы от выбракованных и рабочих быков	Выявлено серий, содержащих вирус / % выявления
№1	355	74 / 20,8
№2	2676	592 / 22,1
Итого	3031	666/22

2.2.6. Типирование изолятов вируса ИРТ КРС, выделенных из спермы быков-производителей, с помощью ПЦР-ПДРФ

Основой мероприятий по борьбе с ИРТ КРС во многих странах, в том числе и в России, является специфическая профилактика в сочетании с комплексом ветеринарно-хозяйственных мероприятий. В нашей стране широкое применение нашли моно- и ассоциированные вакцины на основе аттенуированного штамма «ТК-А».

Учитывая большой объем вакцинации животных, для повышения эффективности противозооотических мероприятий актуальным является использование методов, позволяющих быстро и эффективно выявлять и дифференцировать полевые и вакцинные штаммы вируса ИРТ КРС.

Разработанная ПЦР с праймерами на ген тимидинкиназы обладает высокой чувствительностью, но не позволяет проводить дифференциацию вакцинных и эпизоотических штаммов вируса ИРТ КРС.

Для выявления и дифференциации вакцинного штамма ТК-А от эпизоотических изолятов вируса ИРТ КРС из спермы быков-производителей применили метод ПЦР-ПДРФ анализа.

Методика основана на том, что его ДНК, в отличие от эпизоотических, не содержит сайт узнавания фермента SacII. В результате электрофореза продуктов рестрикции ДНК вакцинного штамма образуется одна полоса раз-

мером 464 п о , а эпизоотических штаммов и изолятов 2 или 3 полосы, нижние из которых соответствуют 343 и 121 п о

Ранее нами все исследованные штаммы и изоляты вируса ИРТ КРС при помощи ПЦР-ПДРФ анализа были разделены на 3 генетические группы

1 «Соорег-подобные» (Оренбург, 4016)– гидролизуются эндонуклеазами HpaI, SacII,

2 «ТК-подобные» (ТК, М40) – рестриктируются только эндонуклеазой SacII,

3 «ТК-А-подобные» (ТК-А) – не подвергаются рестрикции ферментами HpaI, SacII

В данной работе нами были типированы 7 изолятов вируса, выделенных из спермы быков-производителей

При проведении ПЦР использовали праймеры к области гена ICP18 5 гликопротеина В вируса (Н В.Тикунова и соавт , 2001) Праймер В1 соответствует фрагменту 24002-24021 н , праймер В2 – фрагменту 24464-24445 н (обратный) генома BHV-1 Нумерация нуклеотидов приведена по полной последовательности генома вируса штамма Соорег (M Schwyzer, 1996)

Реакционная смесь содержала 2,5 мкл буфера для Taq-полимеразы, 2,5 мкл 2мМ dNTP, по 2,5 мкл каждого праймера с концентрацией 2мМ, 2,5ед активности термостабильной Taq ДНК-полимеразы В смесь добавляли 5мкл геномной ДНК

Температурный режим амплификации денатурация при 95°C-5 мин, далее 35 циклов по схеме денатурация при 95°C-1 мин, отжиг при 54°C-1 мин, синтез при 72°C-1,5 мин Синтез в последнем цикле при 72°C-3 мин

Праймеры В1 и В2 направляют синтез фрагмента размером 464 п о

Чувствительность ПЦР с праймерами на гВ составила 10^2 ГЦД_{50/мл}

По результатам диагностической ПЦР все изоляты дали положительный результат (синтезировался фрагмент 464 п о) Полученные в результате ПЦР ампликоны подвергли ПДРФ- анализу с использованием эндонуклеаз HpaI и SacII для определения генотипа изолятов

В качестве контролей использовали продукты амплификации ДНК штаммов Оренбург, ТК (эпизоотические) и ТК-А (вакцинный)

Результаты показали, что рестриционные профили изолятов С11 и С15 похожи на штамм Оренбург, то есть гидролизуются рестриктазами HpaI и SacII, и могут быть отнесены к штаммам первой группы («Соорег-подобные»)

У изолята С4, как и у штамма ТК-А, отсутствуют эти сайты рестрикции, что дает основание отнести его к третьей группе «ТК-А-подобных» штаммов и он, видимо, имеет вакцинную природу

Изоляты СО10 и СО12 были отнесены нами ко второй группе штаммов «ТК-подобные», рестриктирующихся только эндонуклеазой SacII

Изоляты С1 и С7 после рестрикции содержали фрагменты, свойственные штаммам первой и третьей групп одновременно Можно предположить, что в данном случае среди животных отмечается совместная циркуляция вакцинного штамма и полевых изолятов

Таблица 7- Характеристика изолятов вируса ИРТ КРС, выделенных из спермы латентно инфицированных быков-производителей

№ п/п	Изолят	Год выделения	Год эксплуатации быка	Генотип по ПЦР-ПДРФ анализу	Титр вируса (lgТЦД ₅₀ /мл)
1	C4	2004	2002	3	6,0
2	C11	2004	1993	1	6,0
3	C1	2004	1985	1+3	5,25
4	C7	2003	1992	1+3	6,0
5	C15	2003	2002	1	6,5
6	CO10	2003	2002	2	6,0
7	CO12	2004	2002	2	5,5

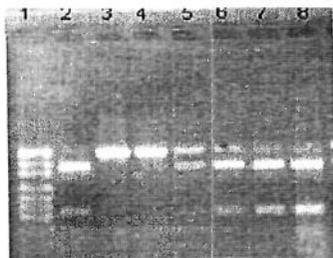


Рис. – ПДРФ-анализ изолятов вируса ИРТ КРС при помощи эндонуклеазы SacI

1 – маркер молекулярного веса (MspI, гидролизат плазмиды pUC19);

2 – штамм Оренбург; 3 – штамм ТК-А; 4 – изолят С4; 5 – изолят С1; 6 – изолят С7;

7 – изолят С11; 8 – изолят СО12

Таким образом, установлено, что среди латентно инфицированных вирусом ИРТ КРС быков-производителей на обследованных племпредприятиях циркулируют изоляты, относящиеся к различным генетическим подгруппам, что может быть использовано при изучении молекулярной эпизоотологии болезни и при планировании противозипизоотических мероприятий.

Полученные данные подчеркивают необходимость более пристального внимания к роли быков-производителей как основных источников возбудителя болезни и проведения оздоровительных мероприятий на племпредприятиях.

Резюмируя полученные данные, можно сделать вывод, что ПЦР с праймерами на ген тимидинкиназы обладает высокой чувствительностью и может эффективно использоваться в комплексе диагностических мероприятий, а также при скрининге спермы быков-производителей на наличие вируса ИРТ КРС на племпредприятиях. С помощью ПЦР на gВ и последующего ПДРФ-анализа можно дифференцировать изоляты вируса на генетические подтипы.

3. ВЫВОДЫ

1 Разработанная диагностическая ПЦР с праймерами, комплементарными последовательностям гена тимидинкиназы (ТК-ген) вируса ИРТ КРС, обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Реакция достоверно выявляет ДНК всех исследованных референтных штаммов и изолятов вируса. В результате амплификации ДНК вируса синтезируется фрагмент 298 п.о.

2 Эффективность ПЦР с праймерами на ТК-ген в среднем выше, чем метода молекулярной гибридизации на 11% и выделения вируса в культуре клеток на 12,3% при исследовании проб биоматериала от больных и инфицированных вирусом животных различных половозрастных групп. Время исследования 100 проб биоматериала составляет 48 часов, что по срокам постановки превосходит метод выделения вируса в 36 раз.

3 Применение метода ПЦР дает возможность выявлять ДНК вируса в пробах, не пригодных для вирусологической диагностики вследствие контаминации микрофлорой, токсичности для культур клеток (вагинальные выделения, абортплоды, сперма). При исследовании биоматериала от абортплодов ПЦР выявляет положительных проб на 16% больше, чем метод молекулярной гибридизации и на 20% больше, чем выделение вируса. ПЦР также эффективнее метода молекулярной гибридизации и выделения вируса на 5% и 2%, соответственно при тестировании биоматериала от телят и на 10,6% и 20%, соответственно при тестировании биоматериала от коров. В сперме быков-производителей ПЦР выявляет на 13,5% больше положительных проб, чем два других метода.

4 ПЦР с праймерами на ТК-ген выявляет ДНК вируса во всех описанных в литературе органах-мишенях для его репликации в пробах легких (32,3%), трахеи (39,1%), носовой перегородки и слизистой носа (44%), носовых выделениях телят (39,7%), вагинальных выделениях (36,7%), молоке (28,6%), экссудате и слизистой оболочке матки (11,5%) коров и телок.

5 Контаминация банка спермы вирусом ИРТ КРС на двух племпредприятиях, изученная при помощи ПЦР с праймерами на ТК-ген, составляет в среднем 22%. ПЦР позволяет давать оценку спермы на наличие в ней ДНК вируса ИРТ КРС и решать вопрос о ее пригодности к использованию.

6 Генотипирование 7 изолятов вируса ИРТ КРС, выделенных из спермы быков-производителей, с использованием ПЦР на ген гликопротеина В вируса с последующим ПДРФ анализом ампликонов при помощи рестриктаз HpaI и SacII установило их различную природу. Один изолят отнесен к группе «вакцинных», четыре к группе эпизоотических (два «респираторные» и два «генитальные»), а остальные имели «смешанный» профиль, соответствующий ДНК вакцинного («ТК-А») и эпизоотического штаммов.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основании проведенных исследований рекомендовано

1 Учитывая высокую чувствительность ПЦР с праймерами на ген тимидинкиназы, включить данный метод в схему диагностических исследований на инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота, в том числе использовать для скрининговых исследований банков спермы на наличие вируса и решения вопроса о ее пригодности к использованию,

2 ПЦР-ПДРФ анализ использовать в племенных хозяйствах и на племпредприятиях в случае необходимости проведения дифференциальных диагностических исследований, а также при изучении молекулярной эпизоотологии болезни.

5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1 Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота: меры профилактики и борьбы в современных условиях/ Соавт А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко// Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей Матер. междунар. науч.-практ. конф. ВНИИВВиМ (Покров, 16-18 апреля 2002) -Покров, 2002 -С -105-107.

2 Выявление ДНК вируса ИРТ КРС в пробах биоматериала от больных телят при помощи ПЦР/ Соавт А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко и др // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. Матер. междунар. науч.-практ. Конф (Воронеж, 23-25 сентября 2002) - Воронеж, 2002 - С 194-195

3 Разработка и сравнительная эффективность тест-систем на основе молекулярной гибридизации и полимеразной цепной реакции для выявления вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота/Соавт А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко и др // Генодиагностика инфекционных заболеваний Сборник тезисов 4-й Всероссийской науч.-практ. конф (Москва, 22-24 октября 2002) - Москва, 2002.- С 327-330

4 Выявление ДНК вируса ИРТ КРС с помощью полимеразной цепной реакции/ Соавт.: А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, Н.В. Носкова и др // Ветеринария.- 2003 - № 5- С -21-24

5 Спектр микроорганизмов, выделенных от коров с гинекологической патологией в стационарно неблагополучных по ИРТ КРС хозяйствах/ Соавт.: А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко и др // Материалы 2-й Международ. Научно-практ. конф. Ставропольского ГАУ, Ставрополь, 2003 - С 296-298

6. Использование полимеразной цепной реакции для экспресс - диагностики ИРТ крупного рогатого скота/ Соавт А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, Н.В. Некрасова// Аграрная наука Сибири, Монголии, Казахстана и Башкортостана – сельскому хозяйству Труды 6-й Междунар. науч.-практ. конф (Павлодар, 9-10 июля 2003 г.), РАСХН Сиб Отд-ние, Новосибирск, 2003 - С 113-115

7 Дифференциация изолятов вируса ИРТ КРС с помощью ПЦР-ПДРФ анализа/ Соавт Е В Жиравковская, С Ф Орешкова, А Г Глотов и др // Ветеринария - 2004 - № 11 - С 17-21

8 Пат 2259398 Российская Федерация, МПК⁷ С 12 N 15/38, С 12 Q 1/68 Синтетические олигонуклеотидные праймеры и способ выявления ДНК вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота с помощью специфических олигонуклеотидных праймеров в полимеразной цепной реакции (ПЦР)/Соавт А Г Глотов, Т И Глотова, Н В Некрасова и др , заявитель и патентообладатель ГНУ ИЭВСидВ СО РАСХН - №2003136419, заявл 18 12 03, опубл 27 08 05, Бюл №24

9 Пат 2265059 Российская Федерация, МПК⁷ С 12 Q 1/68, А 61 D 19/02 Способ оценки спермы быков-производителей на контаминацию вирусом инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота/Соавт А Г Глотов, Т И. Глотова, А В Нефедченко, заявитель и патентообладатель ГНУ ИЭВСидВ СО РАСХН - №2003125159/15 (026590), заявл 11 08 03, опубл 27 11 05, Бюл №33

Подписано в печать 09 11 2006 г Формат 60×84 ¹/₁₆
Печ л 1,0 Тираж 100 экз Заказ № 429

ИПЦ «Юпитер»
630501, Новосибирская область, пос Краснообск