

ставляла 60 и 40% соответственно.

При внутрибрюшинном методе заражения через 10 дней отмечались в одном случае незначительное узелки в печени и на 30-й день незначительное увеличение селезенки. Культуру выделить не удалось.

При заражении *M. avium* подкожно изменений во внутренних органах не отмечались, культуру выделили только к концу опыта (на 60-й день) и высеваемость составила 40%.

Внутрибрюшинное заражение вызывало незначительное увеличение печени через 10 дней после заражения, увеличение селезенки, к концу опыта на сальнике в области поджелудочной железы – образование узелков. Высеваемость составляла 100% на протяжении всего опыта.

Выводы

1. Установлено, что при внутрибрюшинном заражении культурами атипичных микобактерий — *M. kansasii*, *M. xenopi* и *M. fortuitum* закономерно выявляется жемчужница на сальнике в области поджелудочной железы.

2. Культуры *M. kansasii* и *M. xenopi* закономерно выделяются (100%) в первые

20 после заражения морских свинок. Культура *M. Fortuitum* не выделяются на протяжении всего периода опыта (60 дней).

3. Подкожное заражение белых мышей культурой *M. bovis* вызывают патологоанатомические изменения через 30 дней, а внутрибрюшинное — через 10 дней и характеризуется более тяжелым течением инфекционного процесса: увеличением селезенки, узелки в печени и легких.

4. Установлено, что подкожное и внутрибрюшинное заражение *M. bridge* закономерно вызывает у белых мышей очаговый, а иногда и диффузный некроз хвоста, что может являться дифференцирующим признаком при идентификации микобактерий.

5. Культура *M. avium* вызывала у белых мышей патологоанатомические изменения только при внутрибрюшинном методе заражения на 60-й день, но культуру выделяли в течение всего срока опыта (100%).

6. Подкожное и внутрибрюшинное заражение *M. fortuitum* не вызывает у белых мышей патологоанатомических изменений, культура в течение срока исследований не выделялась.

SUMMARY

Results of infection *M. kansasii*, *M. phlei*, *M. fortuitum*, *M. xenopi*, *M. gordonae* of guinea pigs and mice by different methods are given here. Have been determined some pathological changes typical for several species.

Литература

1. Гращенкова Ш.В., Зыков М.П. Вирулентность микобактерий туберкулеза, циркулирующих на Крайнем Севере // Пробл. туб. 1984, № 7. С. 51–55.
2. Кассич Ю.Я., Борзяк А.Ф., Кочмарский А.Ф., Марта О.В., Нечваль И.Т., Овдиенко Н.П., Павлас М., Шаров А.Н., Шуревский В.Е. Туберкулез и меры борьбы с ним. Киев: Урожай, 1990. 304 с.
3. Н.М. Макаревич. Атипичные микобактерии: методы идентификации, источники выделения, значение в клинике туберкулеза: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 1973. 31 с.
4. Оттен Т.Ф., Васильев А.В., Микобактериоз. С-Пб, 2005. 218 с.
5. Merone A., Saggiomo G., Severino G., Capone D., De Vinceti G. Minerva pediat. 2001. 53. № 6. P. 587–590.
6. Seeger I. Vorkommen und Bedeutung atypischer Mykobakterien der Gruppe II nach Runyon bei Schweinen, Hühnern und Hunder. Zbl. Bakt., I Abl. Orig., 1969, 210, 4. S. 517–524.
7. Wolinsky E. Micobacterial diseases oster than tuberculosis // Clin.infect. Dis.-1992. Vol. 15. P. 1–12.

УДК 619:616-074:578.8077:636.2

Е.А. Гладырь, Н.А. Зиновьева, А.А. Ермилов, В.Н. Виноградов, Л.К. Эрнст
(Вероссийский государственный научно-исследовательский институт животноводства, Экспериментальное хозяйство ОНО «Кленово-Чегодаево»)

СОЗДАНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АПРОБАЦИЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ТЕСТ- СИСТЕМЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Введение

Поиск эффективных путей преодоления проблемы повсеместного распростра-

нения такого заболевания крупного рогатого скота, как лейкоз (ВЛКРС), является одной из важнейших задач не только вете-

ринарной медицины, животноводства, но и биотехнологии. Наличие у вируса лейкоза КРС близкого морфологического и эволюционного родства с вирусом Т-клеточного лейкоза человека, способность некоторых онкогенных вирусов преодолевать межвидовые барьеры, а также устойчивая тенденция роста выявления этих заболеваний, делает актуальным поиск высокочувствительных методов диагностики вируса в крови не только взрослых животных, но и телят, для обеспечения биологической безопасности жизнедеятельности человека.

В настоящее время для диагностики лейкоза КРС используются несколько методов: *реакция иммунной диффузии* (РИД) — основной метод диагностики лейкоза КРС, *иммуноферментный анализ* (ИФА), *гематологические исследования* и *полимеразная цепная реакция* (ПЦР). ПЦР — современный прямой метод диагностики многих инфекций, в том числе лейкоза. Этот метод обладает максимальной чувствительностью и высокой специфичностью. Возможно обнаружение вируса в материале уже через 1—2 недели после заражения. Кроме того, данный метод применим для молодняка старше 15-дневного возраста. Таким образом, ПЦР позволяет с высокой достоверностью выявлять животных на самых ранних стадиях заболевания.

Методика и материал исследований

Учитывая, что вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) сильно мутирует, на первом этапе нами был проведен мониторинг мировых геновых баз данных EMBL и GenBank, содержащих на сегодня соответственно, 70 и 52 варианта ВЛКРС. Для исследований нами был выбран участок ДНК вируса, характеризующийся наибольшей консервативностью для всех описанных на сегодня типов.

На втором этапе нами была разработана тест-система, основанная на определении фрагмента гена *env* ВЛКРС (рис. 1). Система базируется на проведении так называемой двойной ПЦР («Nested-PCR») сначала с наружными, а затем с внутренними праймерами. Использование принципа двойной ПЦР позволяет повысить чувствительность метода в несколько тысяч раз. При проведении ПЦР-анализа на наличие ВЛКРС нами также предусмотрено проведение ПЦР контрольного гена, что исключает наличие ложноотрицательных результатов, вызванных плохим качеством ДНК.

Исследования проводились на коровах и телятах старше 2-х недельного возраста.

Материалом для анализа служила цельная кровь, взятая из яремной вены в одноразовые вакуумные пластиковые пробирки, содержащие в качестве консерванта ЭДТА. Аликвоты крови (по 200 мкл) переносили в одноразовые пластиковые пробирки типа Eppendorf, добавляли в каждую 800 мкл буфера $T_{10}E_{10}$ и откручивали при 7000 об/мин 2 мин для визуализации осадка лейкоцитов. Отмывку в буфере $T_{10}E_{10}$ повторяли 2-хратно. ДНК выделяли по методике с использованием НСС колонок (Agrobiosgen) по протоколу, рекомендованному производителем и по методикам, используемым в Центре биотехнологии и молекулярной диагностики ВИЖ. Первую ПЦР проводили в конечном объеме 15 мкл и 1 мкл тестируемой ДНК. Кроме исследуемых проб целесообразно при постановке каждой ПЦР ставить внутренних положительных (ДНК известного вирусоносителя) и отрицательный (вода) контроли. По окончании 38 стандартных циклов ПЦР аликвоту 0,5 мкл 1-ой реакции переносили в чистую пробирку содержащую 24 мкл 2-ой ПЦР-смеси. Для анализа амплифицированных фрагментов ДНК и выявления вирусоносителей использовали метод гель-электрофореза. Электрофоретическое разделение проводили при 120 В в 1,8% агарозном геле в буфере TAE с добавлением бромистого димидия до конечной концентрации 30 нг/мл, после чего выполняли визуализацию продуктов ПЦР-ПДРФ под ультрафиолетовым светом. Документацию полученных результатов осуществляли, используя программу Bio DOC ANALYSER (BIOMETRA.). На фореграмме (рис. 1) четко идентифицируются: 1,2,3 — животные-вирусоносители, 4,5 — здоровые животные, 6 — положительный контроль, 7 — отрицательный контроль (H₂O).

Результаты

За 9 месяцев — с 1 марта по 1 декабря 2005 г. для ПЦР анализа из ОНО «Кленово-Чегодаево» в Центр биотехнологии и молекулярной диагностики ВИЖ поступило 1250 проб крови крупного рогатого скота с 4-х ферм хозяйства. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таким образом, среди исследованного нами поголовья животных ОНО «Кленово-Чегодаево» было выявлено 228 вирусоносителей, причем коров, в крови которых диагностировался вирус, было примерно на 3% больше, чем телят.

Телок, достигших 6-ти месячного возраста и отрицательных по ПЦР, проверяли во Всероссийском институте эксперимен-

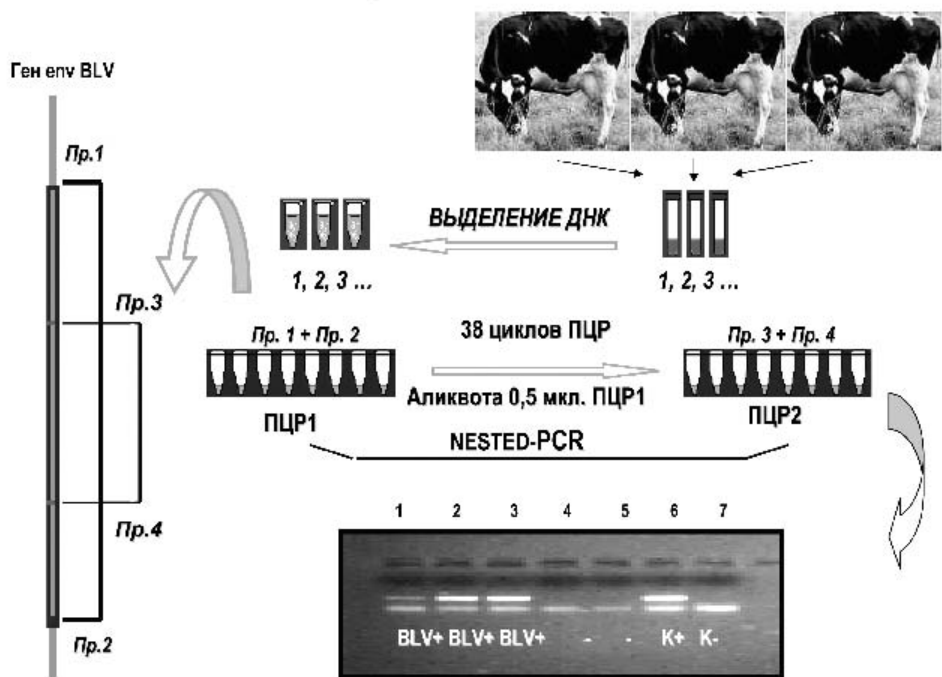


Рисунок 1. Схема исследований

тальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко (ВИЭВ) на носительство ВЛКРС с использованием РИД. Данные сравнительных исследований по соответствующим периодам 2004/2005 гг. представлены в таблице 2.

При сравнении по данным РИД аналогичных периодов 2004/2005 годов (табл. 2), произошло снижение инфицированности 6-ти месячного молодняка ОНО «Кленово-Чегодаево» вирусом лейкоза в 6,5 раза, что говорит о высокой эффективности ранней диагностики вируса лейкоза в крови телят. Наличие ПЦР-отрицательных животных среди РИД-положительных коров и телок старше 6-ти месяцев на сегодня с точки зрения научных исследова-

ний не находит объяснений. При этом следует отметить, что подобные результаты описаны в литературных источниках. Имеются также данные, что лейкоциты животных РИД+/ПЦР- по своим свойствам аналогичны свойствам здоровых животных. Одной из возможных причин такого феномена может быть наличие мутаций в амплифицируемой области, которые влияют на свойства вируса, однако, не затрагивают его антигенные детерминанты.

Таким образом, применение ПЦР в комплексе противолейкозных мероприятий обеспечивает более раннее и полное выявление зараженных животных и сокращает сроки оздоровления стада.

Результаты исследования поголовья ОНО «Кленово-Чегодаево»

Таблица 1

Группа	Исследовано голов	Всего BLV, + и +/-	
		гол	%
Телята от 2 недель и старше	816	141	17,28
Коровы	434	87	20,05

+/- — животные с очень низким титром, требующие повторного взятия крови

Эффект использования ПЦР в ранней диагностике

Таблица 2

Временной интервал	2004 г.			2005 г.		
	Всего РИД, гол.	Из них BLV+	% BLV+	Всего РИД, гол.	Из них BLV+	% BLV+
3 смежных месяца (август, сентябрь, октябрь)	364	57	15,66	208	5	2,40

РЕЗЮМЕ

На основе мониторинга мировых генных баз данных EMBL и GenBank и с использованием метода ПЦР, разработана и экспериментально апробирована на 1250 головах высокочувствительная тест-система диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС). Применение данной разработки позволило снизить инфицированность вирусом лейкоза 6-ти месячных телок ОНО «Кленово-Чегодаево» в 6,5 раза. Таким образом, применение ПЦР в комплексе противолейкозных мероприятий обеспечивает более раннее и полное выявление зараженных животных и сокращает сроки оздоровления стада.

SUMMARY

On the base of the monitoring of the world gene banks EMBL and GenBank using the RCR method the high sensitive testing system for diagnostics of the bovine leukemia virus (BLV) was developed and approved for the testing of 1250 animal samples. Introduction of the developed system in the farm "Klenovo-Chegodaevo" made it possible in 6.5 times to decrease the percent of the infected animals among the 6 months old calves. Thus the using of the PCR together to anti-leukemia measure provides the earlier and fuller detection of the infected animals and decreases the period of the full recovery of the flock.

А.М. Смирнов

(Отделение ветеринарной медицины РАСХН)

ЗАДАЧИ ВЕТЕРИНАРНОЙ НАУКИ И ПРАКТИКИ В РАМКАХ НАЦИОНАЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ЗАЩИТЫ НАСЕЛЕНИЯ ОТ ПАНДЕМИИ И ПАНЗООТИИ ГРИППА ПТИЦ

Проблема профилактики и борьбы с гриппом птиц является весьма актуальной.

Существует два мнения о возникшей эпизоотии гриппа птиц. Первое — это эпизоотия искусственного происхождения — вроде мы отказались от «ножек Буша» и получили птичий грипп. Кстати, это мнение усиленно муссируется прессой, также обвиняют в этом и науку.

И второе мнение объективное, которое предостерегает о том, что если ослабить соответствующие профилактические и карантинные ветеринарно-санитарные мероприятия, то эпизоотия может принять характер панзоотии, которая повлечет большие экономические потери и в случае мутации вируса гриппа — массовое заболевание людей с летальным исходом.

Сказанное подтверждается, какими быстрыми темпами вирус гриппа птиц распространяется в нашей стране: лето–осень 2005 г. — вспышки в 80 очагах в ряде районов 6-ти областей Сибири и Дальнего Востока: Новосибирской, Омской, Челябинской, Тюменской, Курганской областей, Алтайского края. В октябре 2005 г. та же беда постигла Тульскую, Тамбовскую и Астраханскую области.

Птичий грипп также активно захватывает Европу. За последние месяцы текущего года он зарегистрирован в 11 странах: во Франции, Румынии, Словакии, Швейца-

рии, Италии, Германии, Австрии, Словении, Венгрии, Греции, Хорватии, Польше.

Также существует ошибочное мнение о том, что грипп птиц появился недавно и распространен преимущественно в Юго-Восточной Азии.

На самом деле ВГП (подтип H7N7) изолировали от больных цыплят более 100 лет тому назад, а именно в 1902 г. в Италии, то есть за 31 год до открытия вируса гриппа человека.

За последние 200 лет его наиболее патогенную форму, названную чумой кур, неоднократно регистрировали на всех континентах земного шара.

В нашей стране тяжелые вспышки болезни наблюдали в 60–70 годах прошлого века в Московской, Калининской, Калужской, Рязанской, Тульской и ряде других областей. И хотя с 1992 г. Россию считают благополучной по данной инфекции, тем не менее есть основания предполагать, что среди диких и домашних птиц в нашей стране, как и во многих других регионах мира, циркулируют штаммы ВГП с пониженной вирулентностью.

Периодически происходят изменения антигенов (гемагглютинина Н и нейраминидазы N) ВГП, ответственные за патогенные свойства агента и его способность преодолевать межвидовые барьеры. Различные подтипы возбудителя вы-