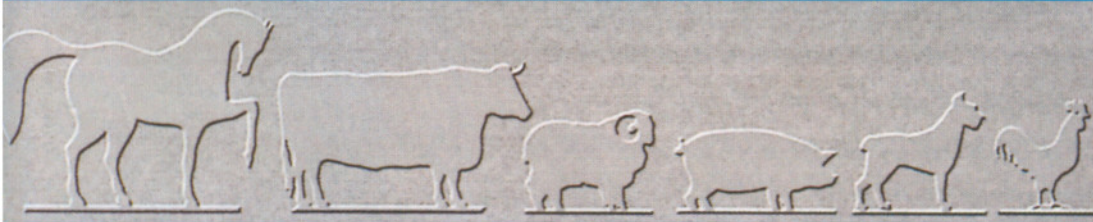


05
B 39

Иркутск
С.М. С.33

ISSN 0042 - 4846

ВЕТЕРИНАРИЯ



С НОВЫМ ГОДОМ!

1 • 2012

На начальном этапе изучали динамику роста и изменения основных параметров культивирования листерий по традиционной технологии. Анализ этих данных показал, что технологические параметры (рН, еН, рО₂ и др.) при выращивании листерий не оптимальны. Культивирование этих микроорганизмов по традиционной технологии длится 16 – 20 ч, а максимальная концентрация их составляет не более 5 – 6 млрд/см³.

В последующем разработали управляемый процесс культивирования листерий в ферментерах, регламентирующий добавление в питательную среду глюкозы, уровень окислительно-восстановительного потенциала культуральной жидкости по фазам роста, стабилизацию растворенного кислорода и рН на оптимальных уровнях, подачу пеногасителя и т.д. Оптимальная продолжительность процесса составила 7 – 9 ч, а накопление 12 – 15 млрд/см³.

Сущность данного процесса культивирования заключается в том, что на усовершенствованной питательной среде выращивали листерии при 37 °С в течение 8 ч. После засева еН культуральной жидкости снижали до минус 190 мВ путем выдержки культуры без подачи воздуха на аэрацию и выключенной мешалке. Затем до конца культивирования с помощью изменения расхода воздуха и скорости вращения мешалки поддерживали парциальное давление растворенного в культуральной жидкости кислорода на уровне 15 % от насыщения кислородом воздуха. рН культуральной жидкости регулировали 10%-ным раствором NaOH, а дробную подачу глюкозы осуществляли дозами до концентрации 0,2 % при лимитировании роста листерий, характеризующегося резким повышением рО₂ при неизменных показателях расхода воздуха и оборотов мешалки и прекращением снижения рН культуральной жидкости.

В процессе исследований оптимизировали состав защитной среды на калий-фосфатном буферном растворе. Разработанная питательная среда и режимы управляемого культивирования листерий позволили уменьшить продолжительность

фазы приспособления до 0,5 ч, увеличить максимальное накопление бактерий в 2,3 раза и сократить время культивирования в 2,1 раза. Полученные культуры листерий при управляемом выращивании в ферментерах по биологическим свойствам были типичными.

Из культуры листерий, выращенных в экспериментальных условиях, изготовили опытно-промышленные серии вакцины, которые успешно испытали в хозяйствах.

Заключение. Для выращивания вакцинных штаммов листерий были разработаны питательные среды на основе перевара Хоттингера и аминокептида. Состав питательной среды и управляемый режим культивирования позволили увеличить максимальное накопление бактерий в 2,1 раза и сократить время культивирования до 7 – 9 ч. Новая защитная среда по сравнению с традиционной повысила сохраняемость жизнеспособных микроорганизмов в вакцине при длительном хранении на 20 – 40 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакулов И.А. Основные вехи истории изучения листериоза животных и людей // Мат-лы Межд. симп. "Листериоз на рубеже тысячелетий". – Покров, 1999. 43 – 47.
2. Бирюков В.В., Кантере В.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. – М.: Наука, 1985. 293 с.
3. Кантере В.М. Теоретические основы технологии микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1991. 272 с.
4. Нежута А.А., Токарик Э.Ф., Самуйленко А.Я., Безгин В.М., Сербис Е.С. Теоретические и практические основы технологии сублимационного высушивания биопрепаратов. – Курск, Издательство Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2002. 240 с.
5. Самуйленко А.Я., Рубан Е.А. Основы биотехнологии производства биологических препаратов. (Теоретические основы, оборудование, технологические линии). – М., 2000. 782 с.

УДК 619:636.09:606

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАРВОВИРУСА СВИНЕЙ

Александра Дмитриевна Козлова, научный сотрудник, kozlova-aleksandra@yandex.ru

Игорь Леонидович Обухов, д.б.н., профессор, заведующий отделом

ФГУ Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов

Татьяна Станиславовна Астахова, к.б.н., научный сотрудник

ФГУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии,
тел. (495) 974-96-46

Важным этапом эпизоотического обследования при парвовирусной инфекции свиней является своевременная диагностика. Разработанная тест-система для выявления ДНК парвовируса свиней в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме "реального времени" успешно прошла комиссионные испытания и рекомендована к регистрации в Российской Федерации. **Ключевые слова:** парвовирус свиней, полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Polymerase chain reaction for detection of parvovirus infection of pigs

A.D. Kozlova, I.L. Obukhov, T.S. Astakhova

Parvovirus infection of pigs causes significant economic damage to swine industry of the Russian Federation. An important stage of the epizootic survey is timely diagnosis. Developed test system for detecting porcine parvovirus DNA in biological samples using the real time polymerase chain reaction (PCR) approbation and recommended for registration in the Russian Federation. **Key words:** porcine parvovirus, Real-time PCR

Парвовирусная инфекция свиней (ПВИС) – контактно-зоонозное заболевание, проявляющееся репродуктивными нарушениями у супоросных свиноматок. ПВС может быть этиологическим агентом диарей [3, 5], кожных поражений и артритов у свиней [3, 4, 9]. В большинстве случаев протекает бессимптомно [4, 8].

Источником возбудителя болезни являются больные и бессимптомно инфицированные животные, выделяющие вирус с фекалиями, плацентой, носовыми и вагинальными секретами, абортрованными и мертворожденными плодами. У хряков парвовирус может выделяться со спермой [6,7] и при искусственном осеменении наносит значительный экономический ущерб свиноводческим предприятиям, ранее благополучным по ПВИС [2,10].

Возбудитель заболевания – парвовирус свиней рода Parvovirus, семейства Parvoviridae, устойчив к внешним неблагоприятным факторам и сохраняет инфекционность в окружающей среде до 4 – 6 мес [2].

Диагноз на ПВИС ставят комплексно, с учетом эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных с обязательным проведением лабораторных исследований – выделение возбудителя на культуре клеток, обнаружение вирусного антигена в реакции гемагглютинации (РГА), методом иммуноферментного анализа (ИФА) и установление вирусоспецифических антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) [1, 11]. Куль-

туральный метод имеет высокую себестоимость и трудоемок, поэтому чаще в отечественной ветеринарной практике используют РГА и РТГА. Однако РГА может выявлять вирусный антиген только в суспензии внутренних органов абортированных плодов и его не применяют при исследовании спермы. Метод РТГА не дифференцирует поствакцинальные антитела от постинфекционных, поэтому не позволяет обнаруживать вирусоносителей при обследовании вакцинированного поголовья.

В настоящее время для установления ПВИС широко применяют полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Она обладает высокой специфичностью, чувствительностью и позволяет выявлять вирусный генотип даже при низкой вирусной нагрузке в любом биологическом материале.

Цель наших исследований – разработка и апробация ПЦР-тест-системы с гибридационно-флуоресцентной детекцией результатов амплификации в режиме "реального времени" для выявления парвовируса свиней.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы и изоляты приведенные в таблице 1.

Работу тест-системы проверяли на клиническом (фекалии, сыворотка крови, сперма) и патологическом (селезенка, лимфатические узлы, легкие, печень, сердце, кишечник, абортированные плоды и плацента) материале от свиней. Биологический

Таблица 1

Перечень используемых изолятов и штаммов вирусов и бактерий

Возбудитель	Штамм и изолят
Парвовирус свиней (PPV)	Штамм "ВЛ-94"
Цирковирус свиней 2 типа (PCV-2)	НПО "Нарвак"
Вирус болезни Ауески (ADV)	Штамм ГНКИ, Арский, МБА Вакцины "Аускипра-GN" (Laboratorios Hypra) и "Акипор 6.3" (Merial)
Вирус классической чумы свиней (CSFV)	Штамм Синлак, ГМ-94, ЛК-ВНИИВВиМ
Вирус трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV)	НПО "Нарвак"
Вирус эпидемической диареи (PEDV)	ДНК из положительных образцов, подтвержденных секвенированием
Вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV)	"Вирусвакцина против репродуктивно-респираторного синдрома свиней" (ВНИИЗЖ) – штамм БД американского генотипа, вакцина "Amervac" (Laboratorios Hypra) – штамм VP046 европейского генотипа
E. coli	Штамм O141:K99
Chlamydia psittaci	Штамм СК-89
Salmonella enteritidis	Изолят
Leptospira interrogans	Изолят

Таблица 2
Результаты исследований методом ПЦР
в "реальном времени"

Биоматериал	Количество исследованных образцов	Количество образцов, содержащих ДНК ПЧС
Фекалии	146	16
Сыворотка	18	0
Сперма	21	0
Патматериал	135	29
Абортированный плод	62	3
Легкое	26	6
Кишечник	8	2
Плацента	4	0
Итого	420	56

материал получали из нескольких хозяйств Белгородской и Ростовской областей с октября 2008 г. по ноябрь 2010 г.

Суммарную ДНК из материала выделяли с помощью набора "Рибо-преп" (Amplisens, ФГУН "ЦНИИЭ"), согласно инструкции.

Аmplификацию проводили на приборах с флуоресцентным методом детекции в режиме "реального времени" RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия) и iQCyler (BioRad, США) с использованием реактивов Amplisens (ФГУН "ЦНИИЭ").

Результаты исследований. Геном парвовируса свиней представлен одноцепочечной молекулой ДНК, кодирующей 3 структурных белка (VP1 – VP3) и один неструктурный (NS1). После анализа нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank, мишенью для праймеров и зондов выбрали наиболее консервативный ген – NS1.

Специфичность праймеров и зондов проверяли на штаммах и изолятах, приведенных в таблице 1, а также на ДНК генома свиньи. В результате экспериментов доказали отсутствие неспецифической амплификации ДНК гетерологичных штаммов и геномной ДНК свиньи.

Для определения аналитической чувствительности тест-системы получили рекомбинантный контроль путем клонирования участка гена-мишени в фаг λ . Для проведения эксперимента приготовили панели суспензий фекалий, патматериала (смесь разных внутренних органов) и спермы, содержащие $5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^3$, 10^2 и $5 \cdot 10^2$ коп/мл рекомбинантного контроля. При исследовании суспензии фекалий и патматериала чувствительность составила $5 \cdot 10^2$ коп/мл, а при тестировании спермы – $5 \cdot 10^2$ коп/мл.

Важным фактором в работе тест-системы является контроль качества выделения нуклеиновых кислот из биологического материала и исключение ложноотрицательных результатов. Поэтому в тест-систему ввели праймеры и зонд для внутреннего неконкурентного экзогенного контрольного образца, который вносят в каждую пробу на этапе выделения ДНК.

Для контроля прохождения этапа амплификации получили клонированный положительный контрольный образец (ПКО) на основе плазмиды pGEM-t.

На следующем этапе проверили работу тест-системы на биологическом материале, полученном из нескольких свинокомплексов Белгородской и Ростовской областей. Всего исследовали 420 образцов. В 56 (13,3%) пробах выявили ДНК парвовируса свиней (табл. 2).

С 12 по 14 мая 2010 г. в соответствии с приказом Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору МСХ РФ № 53 от 20.03.2006 провели комиссионные межведомственные испытания тест-системы для выявления ДНК парвовируса свиней методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией результатов в режиме "реального времени". Данная тест-система показала 100 %-ную специфичность и высокую чувствительность – $0,15 \lg$ ТЦД₅₀/мл штамма ПЧС "ВЛ-94".

Заключение. Разработанная тест-система для выявления парвовируса свиней с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме "реального времени" успешно прошла комиссионные межведомственные испытания и рекомендована к регистрации в Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

- Елисева О.В. Выявление парвовируса свиней и вирусспецифических антител методами полимеразной цепной реакции и иммуноферментного анализа // Вопросы вирусологии. 2008. Nov-Дец., 53(6). С. 46 – 48.
- Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В. Вирусные болезни животных. – М.: ВНИТИБП, 2001. С. 573 – 584.
- Bergeron J., Hebert B., Tijssen P. Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of nadl-2 and field isolates // Journal Of Virology. Apr. 1996. P. 2508 – 2515.
- Chen H-Y., Li X-K., Cui B-A., Wei Z-Y., Li X-S., Wang Y-B., Zhao L., Wang Z-Y. A TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for the detection of porcine parvovirus // Journal of Virological Methods. 2009. P. 84 – 88.
- Dea S., Elazhary M.A.S.Y., Martineau G.P., Vaillancourt J. Parvovirus-like Particles Associated with Diarrhea in Unweaned Piglet // Can. J. Comp. Med. 1985. 49. P. 343 – 345.
- Guerin B. Viral excretion in boar semen and potential for contamination // Reproduction in Domestic Animals. August 1995. 31. 1. P. 217 – 223.
- Guerin B., Pozzi N. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination // Theriogenology. 2005. 63. P. 556 – 572.
- Nielsen J., Ronsholt L., Sorensen K.J. Experimental in utero infection of pig foetuses with porcine parvovirus (PPV) // Vet. Microbiol. 1991. 28. P. 1 – 11.
- Whitaker H.K., Neu S.M., Pace L.W. Parvovirus infection in pigs with exudative skin disease // J. Vet. Diagn. Invest. 1990. Jul; 2(3). P. 244 – 246.
- Lucas M.H., Cartwright S.F., Wrathall A.E. Genital infection of pigs with porcine parvovirus // J. Comp. Pathol. 1974. Jul; 84(3). P. 347 – 350.
- Mengeling W.L., Lager K.M., Zimmerman J.K., Samarikermani N., Beran G. W. A current assessment of the role of porcine parvovirus as a cause of fetal porcine death // J. Vet. Diagn. Invest. 1991. 3. P. 33 – 35.