

На правах рукописи

ЗИННАТОВ ФАРИТ ФАТИХОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНОДИАГНОСТИКА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА**

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2008

Работа выполнена в научно-исследовательской лаборатории и на кафедре биологической и неорганической химии ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им Н.Э. Баумана».

Научный руководитель: Заслуженный деятель науки РТ и РФ, доктор ветеринарных наук, профессор
Хазипов Нариман Залилович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Шарипова Маргарита Рашидовна
(профессор кафедры микробиологии КГУ, г. Казань)

Заслуженный деятель науки РТ и РФ, доктор ветеринарных наук, профессор
Гаффаров Харис Зарипович
(зав. лабораторией вирусологии отдела биозащиты, ФГОУ «ФЦТРБ – ВНИВИ», г. Казань)

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН г. Казань.

Защита состоится "27" ноября 2008 г. В 13 ч. на заседании Диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская 18, главное здание КГУ, аудитория 211.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета им В.И. Ульянова - Ленина

Автореферат разослан « 23 » октября 2008 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук

З.И. Абрамова

1.ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Лейкоз - это злокачественное хроническое заболевание органов кроветворения, вызывается вирусами лейкоза, характеризуется прогрессирующим увеличением в крови лейкоцитов с последующим развитием опухоли лейкоза и имеет значительное распространение в РФ в том числе и на территории республики Татарстан. Возбудителем лейкоза крупного рогатого скота - является РНК-содержащий вирус семейства *Retroviridae*, ретровирус лейкоза крупного рогатого скота (М. Licursi et al., 2003; М.И. Гулюкин,2005; А.Н. Шаров, 2006;В.А. Сергеев и др., 2007).

Установлена высокая степень сходства вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) с вирусом Т – клеточного лейкоза человека (HTLV-1, Human T- cell leukemia virus), который имеет с ним близкое морфологическое и эволюционное родство, относится также к семейству *Retroviridae*, что свидетельствует об их общем пути в процессе эволюции (В.Н Сюрин и др., 2000; Р.И. Ахмедшина., и др., 2006; Д.Е Белов, 2006). Показана возможность преодоления вирусом лейкоза видовых барьеров (П.В. Филатов и др., 1974; В.П.Шишков, 1979; Н.Fechner, 1995). В условиях эксперимента воспроизведена инфекция вирусом лейкоза крупного рогатого скота у овец (М.И. Гулюкин,2005). Имеются данные об экспериментальном заражении обезьян бычьим лейкозом (А.Ф. Валихов, 1992; В.Н. Сюрин,2000; R. Felmer et al., 2005).

Однако, несмотря на многочисленные исследования, проводимые в данном направлении, окончательного ответа на вопрос о возможности взаимосвязи между заболеваниями лейкоза и другими болезнями опухолевой природы у животных и человека нет (М.Ф. Camargos et al., 2002; G. Monti et al., 2005; R. Felmer et al., 2005).

Несомненно, одной из важнейших проблем онкологии и лейкологии является возможная связь между заболеваемостью лейкозами и опухолями животных и человека.(R.M. Jacobs et al.,1995; С.Kuckleburg et al., 2003). Большой интерес представляют проблемы потенциальной опасности для человека продуктов питания от животных из стад, неблагополучных по лейкозу, влияния вредных метаболитов, накапливающихся в организме больных коров, на организм человека, а также использование животных для получения биопрепаратов. Установлено, что молоко и мясо больных лейкозом животных содержат метаболиты триптофана и других циклических аминокислот, экологически опасные для человека (М.И. Гулюкин, 2005).

Разработка эффективных способов борьбы с лейкозом крупного рогатого скота является одной из важнейших задач не только ветеринарной медицины, животноводства, но и биологии, и экологии в целом, имеющих непосредственное отношение к безопасности здоровья человека.

ВЛКРС является одним из наиболее опасных опухолевых болезней и представляет угрозу для генофонда племенного молочного скота, наносит значительный экономический ущерб животноводству республики, в результате падежа и вынужденной выбраковки животных, утилизации туш, нарушения воспроизводительной функции у больных коров и ограничений в связи с неблагополучием хозяйств (И.Н.Никитин, Б.В. Камалов, 2005).

В силу особенностей инфекционного процесса лейкоза диагностика его серологическими методами исследования не позволяет одномоментно выявить всех инфицированных животных. В связи с этим стал актуальным поиск высокочувствительных методов для ранней диагностики по выявлению вируса лейкоза крупного рогатого скота не только в крови взрослых животных, но и в крови телят до 6-ти месячного возраста, а также в сборном молоке коров.

Из литературных источников известно, что вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (ВИКРС) часто сопровождает вирус лейкоза КРС (О.Ю. Лиманская и др., 2005; Ю.Н.Федоров, О.А. Верховский, 2006). В связи с этим большой интерес представляет изучение степени коинфицированности КРС в неблагополучных по лейкозу хозяйств вирусом иммунодефицита.

Существующие традиционные методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота - реакция иммунной диффузии (РИД), иммуноферментный анализ (ИФА), клинические и патологоанатомические методы, гематологические исследования не обеспечивают полного обнаружения всех инфицированных животных, так как молодняк до 6-ти месячного возраста остается вне плановых исследований в связи с тем, что методы РИД и ИФА практически не пригодны для диагностики лейкоза у телят (С.В.Чичина и др., 2005; G. Monti et al., 2005).

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на обнаружении генома ретровируса, на два порядка чувствительнее и специфичнее иммунологических методов и имеет хорошую перспективу для диагностики лейкоза, так как позволяет определять наличие генов гликопротеина возбудителя лейкоза у телят с 15-дневного возраста, что крайне важно для изоляции зараженных с раннего возраста животных. По данным М.И. Гулюкина (2005); А.Н. Шарова (2006), известно, что метод ПЦР выявляет до 16% животных, зараженных вирусом лейкоза среди РИД-негативных животных, а число зараженных телят достигает до 11,6%. Кроме того, высокая чувствительность метода ПЦР позволяет использовать его для рекогносцировочных исследований путем определения возбудителя в сборном молоке (В.Н. Сюрин и др., 2000; Kuckleburg et al., 2003).

По принятой системе мероприятий по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота предусматриваются многократные исследования животных в неблагополучных хозяйствах с удалением зараженных животных. В связи с этим выявление зараженных животных в наиболее ранние сроки приобретает

особую актуальность, и поэтому применение ПЦР в диагностике лейкоза имеет важное значение, т.к. позволит ускорить сроки оздоровления хозяйств от лейкоза.

Целью исследований являлась оптимизация молекулярной генодиагностики ВЛКРС для оздоровления хозяйств от этой инфекции.

Учитывая вышеизложенное, в настоящей работе поставлены следующие задачи:

- 1. Выяснить эффективность и чувствительность отечественных ПЦР - тест-систем и методику с праймерами на env-ген, рекомендованной M.Lekursi et al., (2003 г.) для диагностики лейкоза КРС.
- 2. Определить возможность использования цельной крови, сыворотки крови, молока и крови телят с 15-ти дневного возраста для диагностики лейкоза крупного рогатого скота методом ПЦР.
- 3. Генотипировать ВЛКРС, циркулирующего на территории сельскохозяйственных предприятий РТ с применением ПЦР – ПДРФ анализа.
- 4. Исследовать циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) в сыворотке крови на наличие в них провирусной ДНК ВЛКРС.
- 5. Определить степень коинфицированности ВЛКРС и ВИКРС животных в хозяйствах Республики Татарстан.

Научная новизна. Подобраны видоспецифические праймеры для идентификации ДНК провируса лейкоза и иммунодефицита КРС. Проведена оценка чувствительности и специфичности тест-систем. Проведено исследование крови и молока крупного рогатого скота из нескольких животноводческих хозяйств на содержание провирусной ДНК ВЛКРС и ВИКРС. Произведено впервые типирование вируса лейкоза крупного рогатого скота циркулирующего на территории Республики Татарстан. Установлена циркуляция провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота в составе циркулирующих иммунных комплексов. Впервые показана коинфицированность зараженных лейкозом молочного скота вирусом иммунодефицита крупного рогатого скота на территории Республики Татарстан.

Практическая значимость Результаты научных исследований были использованы при разработке целевой программы по оздоровлению хозяйств РТ от лейкоза крупного рогатого скота на 2006-2010 гг.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Сравнительный анализ специфичности праймеров, рекомендованных M.Lekursi et al., (2003), с отечественными тест – системами («biokom», и «АмплиСенс») и оптимизация метода ПЦР.
2. Данные исследования проб крови и молока крупного рогатого скота и телят из различных хозяйств РТ на содержание провирусной ДНК ВЛКРС.
3. Типирование вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего на территории Республики.

4.Обнаружение провирусной ДНК ВЛКРС в циркулирующих иммунных комплексах сыворотки крови инфицированных вирусом лейкоза коров.

5.Идентификация коинфицированности крупного рогатого скота ВЛКРС и ВИКРС.

Апробация результатов исследования. Результаты работы доложены и опубликованы в материалах на Международного симпозиума «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний» г. Казань, ФГУ «ФЦТРБ- ВНИВИ», ноябрь 2005; Всероссийской научно – практической конференции «Молодые ученые в реализации национальных проектов» г. Ижевск,2006; Всероссийской научно- производственной конференции, г.Казань,2006; Публикации в Ученых записках ФГОУ ВПО КГАВМ им Н.Э.Баумана- г.Казань 2006-2008гг,182 ,189, 192 тома; в журнале «Ветеринарный врач» №2 2008г, в сборнике трудов юбилейной – научно-практической конференции, посвященной 135 летию КГАВМ. г.Казань-2008г; в методических пособиях «Лейкоз крупного рогатого скота», г.Казань 2005 и 2006г; в материалах Всероссийской научно-исследовательской конференции, г.Казань,2007; на международной студенческой научной конференции «Энтузиазм и творчество студентов в развитии науки», Троицк-2007г; Всероссийской научно – практической конференции «Актуальные вопросы современной биохимии» посвященная 20-ти летию Кировской государственной медицинской академии- г. Киров, 2007; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика» г.Москва 2007; Конференции «IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов» г.Новосибирск-2008г;

Публикации. По материалам диссертации доложено и опубликовано 18 научных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 120 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов, практических предложений, списка использованной литературы и приложения. Работа иллюстрирована 11 таблицами и 17 рисунками. Список использованной литературы включает 182 источника, в том числе 89 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 2005-2008 г в научно исследовательской лаборатории и на кафедре биологической и неорганической химии ФГОУ ВПО КГАВМ им Н.Э. Баумана и апробирована в неблагополучных по лейкозу районах РТ.

Объект исследования - крупный рогатый скот черно-пестрой голштинизированной породы с разной долей голштинизации, принадлежащий сельхозпредприятиям Республики Татарстан.

Предмет исследования - пробы крови и сыворотки крови животных, молоко, а также ДНК, праймеры генов вируса лейкоза крупного рогатого скота env и gag.

Постановку ПЦР проводили с использованием тест-систем «Лейкоз-КРС-Провирус» для диагностики лейкоза крупного рогатого скота, ФГУН ЦНИИЭ - фирмы «АмплиСенс», Gene Pak (фирмы «Bioком»): Экстракцию генетического материала, постановку ПЦР-амплификации участка провирусной ДНК и электрофоретический анализ продуктов ПЦР проводили согласно предложенным методикам и инструкции тест-систем.

ПЦР с использованием методики, рекомендованной M. Licursi et al., (2003), проводили согласно описанию автора, после предварительной экстракции генетического материала с применением Тест-системы для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР): «Лейкоз-КРС-Провирус» для диагностики лейкоза крупного рогатого скота, ФГУН ЦНИИЭ - фирмы «АмплиСенс».

Структура олигонуклеотидных праймеров для изучения области gp51 гена env ВЛКРС взята из статьи M. Licursi et al. (2003).

Внешние праймеры (фрагмент 598 п.н.):

env₅₀₃₂ (5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3')

env₅₀₉₉ (5'-CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT-3')

Внутренние праймеры (фрагмент 444 п.н.):

env₅₅₂₁ (5'-GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG-3')

env₅₆₀₈ (5'-AACACAACCTCTGGGAAGGGT-3')

Аmplицированную провирусную ДНК длиной 444 п.н. разделяли методом горизонтального электрофореза в 1,5-2%-ном агарозном геле с трис-боратным буфером в присутствии бромида этидия (результаты регистрировали с помощью видеосистемы «Gel Imager 2» в компьютер), а также методом вертикального электрофореза в 6%-ном полиакриламидном геле, с последующим окрашиванием геля нитратом серебра.

ПЦР для детекции фрагмента гена pol провирусной ДНК вируса иммунодефицита КРС с использованием методического приема рекомендованного А.П.Лиманским др.,(2005), производили согласно описанию автора. Структура олигонуклеотидных праймеров для изучения гена pol ВЛКРС взята из данной статьи: ВIV1 - ВIV2, который дает при амплификации продукт с молекулярной массой 101 п.н.:

ВIV1 (2343-2366) 5'gAATgTgAACACTTACTgCAATA-3'

ВIV2 (2442-2422) 5'AATCTCggACTACAgATCCgAC-3'

Праймеры синтезированы фирмой «Литех»(Россия).

Типирование изолятов ВЛКРС, геном которого составляет около 9000 пар нуклеотидов (п.н.), было проведено на основе небольшого локуса env-гена длиной 444 п.н. посредством анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДФ-анализа).

Для определения подвидовой принадлежности изолятов ВЛКРС 10 мкл продукта амплификации env-гена длиной 444 п.н., ограниченного внутренними праймерами ENV3-ENV4, после проведения гнездовой ПЦР непосредственно подвергали гидролизу с 5 ед. ферментов рестрикции BglI, PvuII и BamHI («СибЭнзим»). Рестриктию проводили согласно указаниям производителя.

Ампликон длиной 444 п.н. подвергали гидролизу с рестриктазами BglI, PvuII и BamHI. Ранее было показано (D. Veier et al., 2001; M. Licursi et al., 2002; А. П. Лиманский и др., 2005), что рестрикционные образцы для ПЦР-продукта с праймерами ENV1-ENV4 различаются для бельгийского, австралийского и японского изолятов провирусной ДНК ВЛКРС. Для бельгийского подвида образуются следующие продукты рестрикции: при обработке BglI на фрагменты 330 и 115 п.н.; при обработке PvuII - 280 и 164 п.н., для BamHI рестрикция не происходит. Для австралийского варианта ВЛ КРС: при обработке эндонуклеазой BglI образуются рестрикты длиной 330 и 115 п.н., для PvuII рестрикция не происходит; при обработке BamHI - 316 и 128 п.н. Для японского подвида ВЛКРС характерны следующие образцы рестрикции: при обработке BglI на фрагменты 330 и 115 п.н., для PvuII сайты рестрикции не существуют, при обработке BamHI - 316 и 128 п.н.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2000.

Эпизоотическая обстановка по лейкозу крупного рогатого скота в отдельных районах изучена на основе данных ветеринарной службы за 5 лет (2001-2006 гг.) ГУВ КМ РТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Сравнение различных ПЦР Тест-систем для обнаружения провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота

Эффективность разработанных двумя фирмами ПЦР-тест-систем для диагностики лейкоза крупного рогатого скота, а также методики с использованием праймеров на env-ген рекомендованной M. Licursi et al., (2003), изучали в производственных условиях на биоматериале, полученном от животных разных половозрастных групп.

Пробы биоматериала отбирали от животных непосредственно в неблагополучных по лейкозу хозяйствах, учитывая эпизоотологические данные районов.

Исследовались на лейкоз 96 проб крови, из которых 91 проба – кровь дойных коров, и 5 проб крови телят, в том числе 36 проб РИД положительные на лейкоз, 55-РИД отрицательно реагирующие на вирус лейкоза КРС, 5 проб крови телят 15-20 дневного возраста, не исследованные серологически. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Табл. 1.

Результаты сравнения используемых нами ПЦР тест-систем и праймера для диагностики ВЛКРС

№ п.п	Исследуемый район	Кол-во исслед. всего гол.			Количество ПЦР положительных проб в результате использования тест-систем:		
		Всего	Вт.ч. РИД (+)	РИД (-)	GenePak DNA PCR test (gag) «Биоком» 347 п.н.	ФГУН ЦНИИЭ-«ДНК-сорб-В» фирмы «АмплиСенс» 294 п.н.	Праймеры разработанные M.Lekursi et al., (env). (2003г) 444 п.н.
1	В-Услонский	12	0	12	2	3	3
2	Высокогорский	34	20	14	20	16	22
3	Зеленодольский	22	0	22	7	5	8
4	Нижнекамский	28	16	12	24	19	24
5	ИТОГО	96	36	60	53	43	58

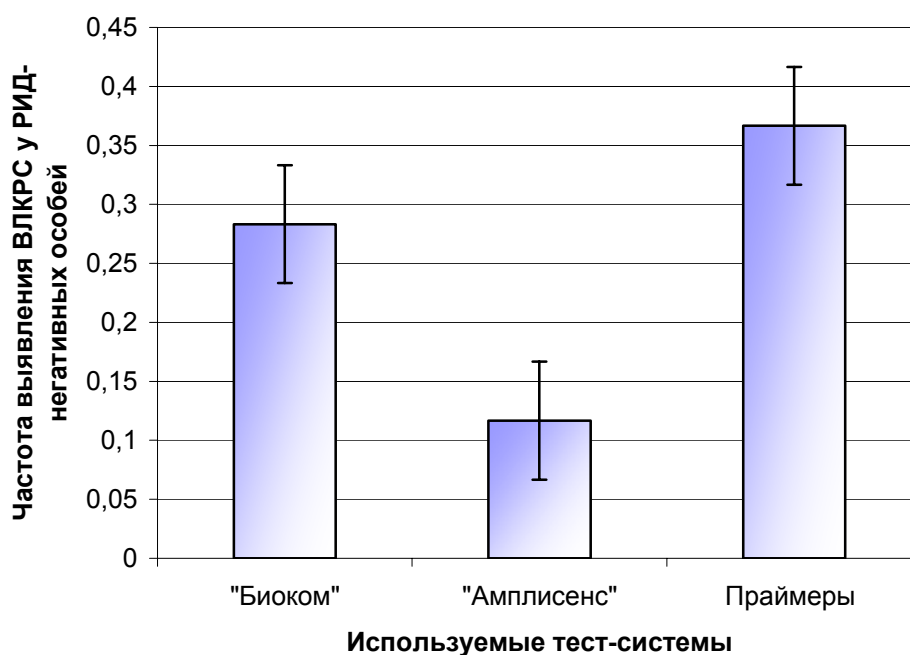


Рис. 1. Сравнительные данные различных тест-систем и метода M.Lekursi, основанные на показателях 95% доверительного интервала.

Согласно результатам анализа (рис.1), наименьшей чувствительностью к выявлению ВЛКРС обладает набор компании «Амплисенс» (дополнительно выявляется только 7 образцов у РИД-негативных животных). Достоверно большей чувствительностью ($p < 0,05$) обладает тест-система фирмы «Биоком» и метод предложенный M.Lekursi et al., основанный на использовании праймеров на env-ген (дополнительно выявляется 17 и 22 образца соответственно), при этом использование праймеров позволяет выявлять большее количество инфицированных животных .

Чувствительность праймеров M. Lekursi et al., в среднем на 26% выше, чем тест- система ФГУН ЦНИИЭ- «ДНК-сорб-В» фирмы «АмплиСенс» и на 9% выше чем тест - система GenePak DNA PCR test (gag) «Биоком».

2. Исследование крови коров и телят с применением метода ПЦР

Материалом для исследований служили пробы крови и молока дойного поголовья, а также крови телят, начиная с 15-дневного возраста (по согласованию с ГУ ветеринарии РТ).

Используя отработанный метод, рекомендованный M. Licursi et al., (2003) нами исследовано 375 голов животных в т.ч. 274 головы коров и 101 теленок.

Результаты проведенных исследований коров, представленных в таблице 2 и рисунке 2, свидетельствуют о том, что среди РИД (+) (232 гол) ПЦР (+) было 203 головы, т.е. 13 % животных не несут в себе провирусную ДНК, а среди РИД (-) (28 гол) у 17 животных (60%) провирусная ДНК выявлена в геноме животного.

Табл.2.

Сравнительные данные исследований проб крови коров на выявление ВЛКРС различными методами

№п.п	Исследуемый район	Всего гол.	РИД(+)	РИД(-)	ПЦР(+)	ПЦР(-)	Гем (+)	Гем (-)
Дойные коровы								
1	Буинский	18	18	---	18	----	----	18
2	В-Услонский	15	15	----	15	----	----	15
3	Зеленодольский	22	22	----	22	----	----	22
4	Нижнекамский	219	177	28	179	40	14	177
5	Всего	274	232	28	234	40	14	232

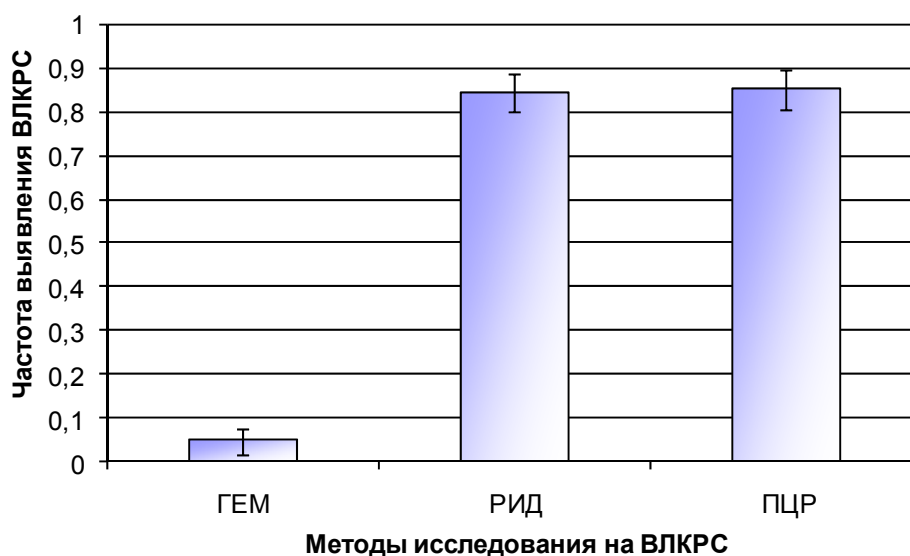


Рис.2. Результаты исследования крови коров с применением метода ПЦР, основанные на показателях 95% доверительного интервала.

По результатам исследований видно, что достоверно большей чувствительностью обладает ПЦР метод, основанный на использовании праймеров на env-ген ($p < 0,05$).

Следовательно, серологические методы исследования не достаточны для характеристики истинной эпизоотической ситуации в животноводческих хозяйствах.

По результатам этих исследований можно заключить, что ПЦР в крови выявляет инфицированных вирусом лейкоза животных, не диагностируемых методом РИД. По нашим данным, дополнительно выявляемых инфицированных вирусом лейкоза животных составляет 6%.

Полученные нами данные о возможности выявления инфицированных животных дополнительно у РИД отрицательных животных совпадают с результатами исследований М.И. Гулюкина (2005); А.Н. Шарова (2006); Е.В. Дробот (2007).

В настоящее время традиционные методы лабораторной диагностики лейкоза крупного рогатого скота в РИД и ИФА для исследования телят до 6 месячного возраста не применимы, так как являются иммунологическими и телята до 6-ти месячного возраста остаются вне плановых исследований. Метод ПЦР позволяет обнаружить наличие генома вируса, а потому позволяет обнаружить инфицированных животных независимо от их возраста. В связи с этим были исследованы пробы крови телят из хозяйств, где доля РИД положительных коров составляет выше 30%.

Результаты этих исследований крови телят до 6-ти месячного возраста представлены в таблице 3, из которой видно, что у 21 % исследованных телят в крови обнаруживается ДНК провируса лейкоза КРС.

Табл. 3.

Результаты исследований проб крови телят методом ПЦР.

Исследуемый район	Телята		
	Всего голов	(ПЦР+)	(ПЦР-)
Зеленодольский район д. Нурлаты	7	7	—
Нижнекамский район (ООО «Бахетле-Агро»)	94	15	79
ИТОГО	101	22	79

Примечание: Все телята рождены от серологически и ПЦР положительных коров.

Как видно из таблицы, из 101 головы исследованных животных 22 теленка показали ПЦР положительную реакцию. Данные результаты были подтверждены исследованиями с применением тест-систем двух фирм – «АмплиСенс» и «Віокот».

Эти данные согласуются с результатами исследований М.Licursi et al., (2002, 2003), А.Н. Шарова (2006), которые считают, что процент инфицированных телят составляет до 16 %.

3. Исследования проб молока, полученных из неблагополучных по лейкозу крупного рогатого скота хозяйств РТ

Исследовали пробы молока коров на наличие в них провирусной ДНК ВЛКРС: СХПК «им. Ленина» (д.Нурлаты Зеленодольского района Республики Татарстан) и ООО «БахетлеАгро» ф-ал «Шингальчи», «Каенлы» (Нижнекамский район Республики Татарстан), где инфицированность взрослого поголовья составляет до 55% (Б.В. Камалов, 2006).

Материалом для анализа служило молоко, отобранное индивидуально от РИД - положительных коров и сборное молоко. Образцы молока отбирали из утреннего удоя по 60-100 мл и в термосе со льдом доставляли в лабораторию. Затем проводили изолирование ДНК методом, рекомендованным производителем тест-системы «Лейкоз КРС-провирус» с дальнейшей постановкой ПЦР - метода с праймерами рекомендованными М. Lekursi et al., (2003г). Результаты исследований проб молока представлены в таблице 4.

Табл.4.

Результаты исследований проб молока методом ПЦР

№ п.п	Исследуемый район	Кол-во проб	ПЦР (+)	ПЦР (-)
1	В-Услонский	12	3	9
2	Зеленодольский	22	8	14
3	Нижнекамский, ф-ал «Каенлы» ООО «Бахетле Агро»	28	7	21
4	Нижнекамский ф-ал «Шингальчи» ООО «Бахетле Агро»	74	19	55
5	Всего	136	37	99

Как видно из таблицы 4, что из 136 проб исследованных по ПЦР в 37 случаях был обнаружен вирус лейкоза крупного рогатого скота, что составляет 27 %.

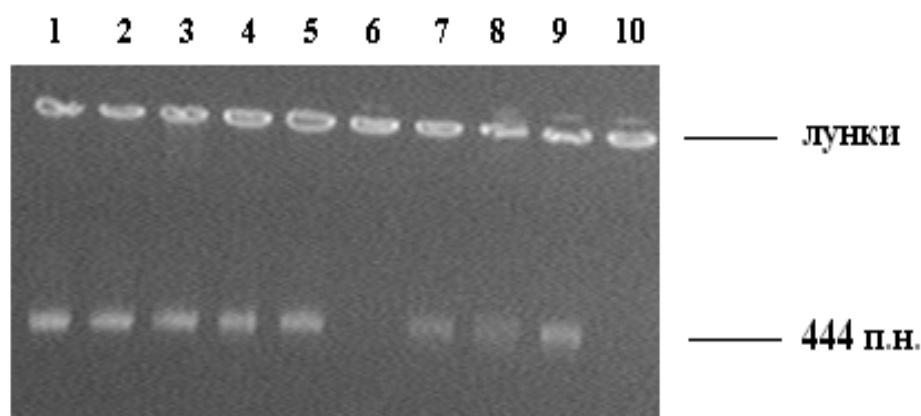


Рис.3. Электрофореграмма результатов ПЦР: 1,2,3,4,5 - пробы крови телят; 6,7,8 - пробы молока; 9–положительный контроль (ДНК вируса лейкоза), 10 –отрицательный контроль (дистиллированная вода).

На электрофореграмме зафиксировано свечение специфической полосы ампликона в пробах 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 (положительный контроль), таким образом, 5 проб крови телят (№ 1,2,3,4,5) и 2 пробы молока (№ 7,8) содержат в себе провирус лейкоза крупного рогатого скота, встроенный в геном лейкоцитов (рис.3). Проба молока №6 свечение не имеет, следовательно, амплификация не прошла из-за отсутствия провируса лейкоза.

По результатам анализа необходимо подчеркнуть, что положительная реакция на ВЛКРС была получена в 5 случаях из 10 проб сборного молока, что составляет 50%. Анализ проб молока представляет интерес для рекогносцировочных исследований, а потому необходимо эту работу продолжать с целью разработки более эффективных приемов подготовки проб и режимов ПЦР. Кроме того, отбор проб молока исключает стресс животных, связанный с взятием крови. Использование образцов молока для проведения молекулярных анализов по выявлению вируса лейкоза крупного рогатого скота является удобным объективным методом для оценки эпизоотической ситуации в хозяйствах.

С эпизоотической точки зрения важно было определить фактор передачи вируса от коровы к теленку горизонтальным, либо вертикальным путем. С этой целью было происследовано 89 проб крови и молока, полученного от коров, реагирующих положительно по серологической реакции-РИД, а также телят, рожденных от тех же самых серопозитивных коров-матерей. Для этого исследовали животных на наличие ДНК провируса лейкоза в СХПК «им. Ленина» (д. Нурлаты Зеленодольского района Республики Татарстан) и ООО «БахетлеАгро» ф-ал «Шингальчи», «Каенлы» (Нижнекамский район Республики Татарстан).

По результатам, представленным в таблице 5 (опыт №1) видно, что в 1-2 месячном возрасте исследовано 42 теленка, из них 8 голов дали ПЦР-положительную реакцию. При исследовании проб крови коров-матерей этих телят также оказались ПЦР положительными. В то же время только в 2-х случаях (коровы Т-701 и 573) в молоке была обнаружена провирусная ДНК ВЛКРС.

Табл.5.

Исследования проб ДНК из крови, молока коров-матерей и крови телят (1-2-х-месячного возраста) (опыт №1)

№п.п	№ теленка	Дата рождения теленка	Результат ПЦР-анализа	№,Корова - мать	Результат ПЦР-анализа	№ молока коровы.	Результат ПЦР анализа
1	1330	15.08.06.	отрицательн.	408	положит	14/1	положит
2	1354	06.07.06.	отрицательн.	607	положит	15/1	положит
3	1352	02.07.06.	отрицательн.	Т27	положит	8/1	положит
4	1350	30.06.06.	отрицательн.	082	положит	13/1	положит
5	1383	18.06.06.	отрицательн.	284	положит	-----	отрицательн.
6	1345	12.07.06	отрицательн.	596	положит	-----	отрицательн.
7	1398	08.07.06.	отрицательн.	621	положит	16/1	положит
8	1376	10.08.06.	отрицательн.	385	положит	1/1	положит

9	1349	03.07.06.	отрицательн.	73	положит	4/1	положит
10	1377	12.07.06.	отрицательн.	К364	положит	-----	отрицательн.
11	1373	10.07.06.	отрицательн.	0409	положит	-----	отрицательн.
12	1344	03.08.06.	отрицательн.	612	положит	-----	отрицательн.
13	1396	10.07.06.	отрицательн.	703	положит	2/1	положит
14	1381	15.07.06.	отрицательн.	0477	положит	-----	отрицательн.
15	1406	03.08.06.	отрицательн.	0010	отрицательн.	-----	отрицательн.
16	1412	15.08.06.	отрицательн.	1036	положит	-----	отрицательн.
17	1400	26.07.06.	отрицательн.	041	положит	18/1	положит
18	1367	11.07.06.	отрицательн.	К619	положит	-----	отрицательн.
20	1363	06.07.06.	положит	Т 701	положит	17/1	положит
21	1351	01.07.06.	положит	Т 27	положит	-----	отрицательн.
22	1389	24.07.06.	положит	К 587	положит	---	отрицательн.
23	1359	06.07.06.	положит	573	положит	12/1	положит
24	1260	04.05.06.	отрицательн.	30	положит	-----	отрицательн.
25	1355	04.07.06.	отрицательн.	963	положит	-----	отрицательн.
26	1300	26.05.06.	отрицательн.	Т 65	положит	-----	отрицательн.
27	1401	26.07.06.	положит	246	положит	-----	отрицательн.
28	1380	15.07.06.	отрицательн.	К 318	отрицательн.	11/1	отрицательн.
29	1390	24.07.06.	положит	248	положит	-----	отрицательн.
30	1365	09.07.06.	отрицательн.	617	положит	-----	отрицательн.
31	1375	09.07.06.	отрицательн.	033	отрицательн.	3/1	отрицательн.
32	1301	08.07.06	отрицательн.	801	положит	-----	положит
33	1374	10.07.06.	отрицательн.	582	положит	-----	отрицательн.
34	1346	09.07.06	отрицательн.	Т 700	положит	7/1	положит
35	1386	17.07.06.	отрицательн.	739	отрицательн.	6/1	отрицательн.
36	1368	11.07.06.	положит	322	положит	-----	отрицательн.
37	1395	10.07.06.	отрицательн.	620	положит	-----	отрицательн.
38	1379	18.07.06.	положит	Т 539	положит	-----	отрицательн.
39	1397	22.07.06.	отрицательн.	704	положит	9/1	положит
40	1370	18.07.06.	отрицательн.	22	положит	-----	отрицательн.
41	1402	31.07.06.	отрицательн.	0485	положит	-----	отрицательн.
42	1391	26.07.06.	отрицательн.	211	положит	5/1	отрицательн.
ИТОГО			8		38		14

Табл.6.

Исследования проб ДНК из крови, молока коров-матерей и крови телят
(2-3-х-месячного возраста) (опыт №2)

№п.п	№ теленка	Дата рождения теленка	Результат ПЦР-анализа	№,Корова - мать	Результат ПЦР-анализа	№ молока коровы.	Результат ПЦР-анализа
1	00583	10.06.06	отрицательн.	225	положит	1	положит
2	00584	10.06.06	отрицательн.	226	положит	3	положит
3	00579	10.06.06.	отрицательн.	227	положит	2	положит
4	00578	10.06.06	отрицательн.	228	положит	4	положит
5	00598	11.06.06.	отрицательн.	229	положит	6	положит
6	00591	09.06.06	отрицательн.	230	положит	7	положит

7	00597	08.06.06.	отрицательн.	233	положит	8	положит
8	00603	03.06.06.	отрицательн.	234	положит	9	отрицательн.
9	00599	08.06.06.	положит	235	положит	10	положит
10	00602	03.06.06.	положит	237	положит	11	отрицательн.
11	00601	04.06.06.	отрицательн.	238	положит	12	отрицательн.
12	4079	15.06.06	отрицательн.	239	положит	13	отрицательн.
13	00595	11.06.06.	отрицательн.	240	положит	15	положит
14	00600	09.06.06.	отрицательн.	241	положит	14	отрицательн.
15	00572	10.06.06.	отрицательн.	242	отрицательн.	16	отрицательн.
16	00574	10.06.06	отрицательн.	243	положит	17	отрицательн.
17	00580	11.06.06.	отрицательн.	245	положит	18	положит
18	00575	09.06.06	положит	246	положит	19	отрицательн.
19	00573	08.06.06.	положит	247	положит	20	отрицательн.
20	00576	15.06.06	отрицательн.	248	положит	21	положит
21	00581	11.06.06.	отрицательн.	249	положит	22	отрицательн.
22	00582	09.06.06.	отрицательн.	250	положит	23	отрицательн.
23	00594	10.06.06.	отрицательн.	251	положит	24	положит
24	00603	18.06.06.	отрицательн.	74	положит	25	положит
25	00607	17.06.06.	отрицательн.	75	положит	26	положит
26	00609	17.06.06.	отрицательн.	76	положит	28	положит
27	00607	19.06.06.	отрицательн.	77	положит	29	отрицательн.
28	00606	18.07.06.	отрицательн.	78	отрицательн.	27	отрицательн.
29	00617	08.07.06.	положит	79	положит	30	положит
30	00612	15.07.06	отрицательн.	80	положит	33	положит
31	00610	11.07.06.	отрицательн.	81	отрицательн.	31	отрицательн.
32	00611	09.07.06.	положит	82	положит	32	положит
33	00613	10.07.06.	отрицательн.	83	положит	34	отрицательн.
34	00615	18.07.06.	положит	84	положит	35	положит
35	00618	11.07.06.	отрицательн.	85	отрицательн.	36	отрицательн.
36	00616	12.07.06.	отрицательн.	86	положит	37	отрицательн.
37	00619	21.07.06	отрицательн.	87	положит	38	отрицательн.
38	00620	07.07.06.	отрицательн.	88	положит	5	отрицательн.
39	00622	18.07.06.	отрицательн.	89	положит	39	положит
40	00624	08.07.06.	положит	90	положит	40	отрицательн.
41	00625	20.07.06	положит	91	положит	41	отрицательн.
42	00626	22.07.06.	положит	92	положит	42	отрицательн.
43	00629	18.07.06.	отрицательн.	93	положит	44	отрицательн.
44	00627	17.07.06.	положит	94	положит	43	положит
45	00621	17.07.06.	положит	95	положит	45	положит
46	00628	19.07.06.	отрицательн.	96	положит	46	положит
47	00623	18.07.06.	отрицательн.	97	положит	47	отрицательн.
ИТОГО			12		43		23

У телят 2-3-х месячного возраста (табл.6) из 47 голов в 12 случаях ПЦР была положительной, коровы-матери этих телят также имеют положительную реакцию, а в молоке этих коров только в 6 случаях обнаружен провирус ВЛКРС. В целом по результатам двух опытов из 89

голов РИД положительных коров в 81 случае в крови обнаружен провирус ВЛКРС, в молоке в 37 случаях, у телят, рожденных от этих коров, в 20 случаях ПЦР положительная реакция, свидетельствующая о наличии провирусной ДНК вируса лейкоза КРС в геноме животного, то есть 22 % телят инфицированы вирусом ВЛКРС.

Учитывая, что до 6-ти месяцев у новорожденных телят сохраняется колостральный иммунитет, можно сделать вывод о том, что заражение телят происходит внутриутробно (вертикальный путь передачи).

Известно, что своевременная изоляция инфицированных телят, и изолированное выращивание их, позволяет оздоровить стадо в более короткие сроки. Из представленных данных видно, что в молоке РИД (+) коров не всегда обнаруживается ВЛКРС, что вероятно, связано с патогенезом лейкоза, так как известно, что вирус размножается в лимфоцитах медленно и лишь через несколько лет развивается лейкоз (к 4-5 годам), а патологические изменения в тканях - лишь к 6-7 годам (D.Bier et al., 2004; М.И. Гулюкин, 2005).

Обобщая результаты исследований проб крови телят до 6 месячного возраста, можно отметить, что методом ПЦР удается диагностировать инфицированность телят, начиная с 15-ти дневного возраста. Это позволяет изолировать зараженных лейкозом телят в раннем возрасте, что важно для сокращения сроков оздоровления хозяйств от этой инфекции.

4. Типирование вируса лейкоза крупного рогатого скота

Для молекулярно-генетических исследований провирусной ДНК ВЛКРС, формировались выборки животных из 5 районов Республики Татарстан.

Постановку ПЦР и генотипирование вируса лейкоза проводили с использованием наиболее информативных, по нашему мнению, биологических жидкостей - пробы крови и сыворотки. Пробы молока отбирали, как альтернативу пробам крови, в диагностике и генотипировании вируса лейкоза крупного рогатого скота.

Для определения подвиговой принадлежности изолятов ВЛКРС 10 мкл продукта амплификации env-гена длиной 444 п.н., ограниченного внутренними праймерами ENV3-ENV4, после проведения ПЦР непосредственно подвергали гидролизу с 5 ед. ферментов рестрикции BglI, PvuII и BamHI («СибЭнзим»). Рестриктию проводили согласно указаниям производителя, а определения подтипа циркулирующего в хозяйствах вируса согласно работе А.П.Лиманского и др., (2005).

При проведении ПЦР сегмента гена env был обнаружен провирус лейкоза крупного рогатого скота в 58 образцах крови. На рисунке 4 приведена типичная картина электрофореза продуктов амплификации (фрагмент гена env, равный 444 п.н.), свидетельствующая о наличие провирусной ДНК вируса лейкоза КРС в геноме животного. После чего данные пробы были исследованы методом ПДРФ-ПЦР анализа с применением ферментов рестрикции BglI, PvuII и BamHI.

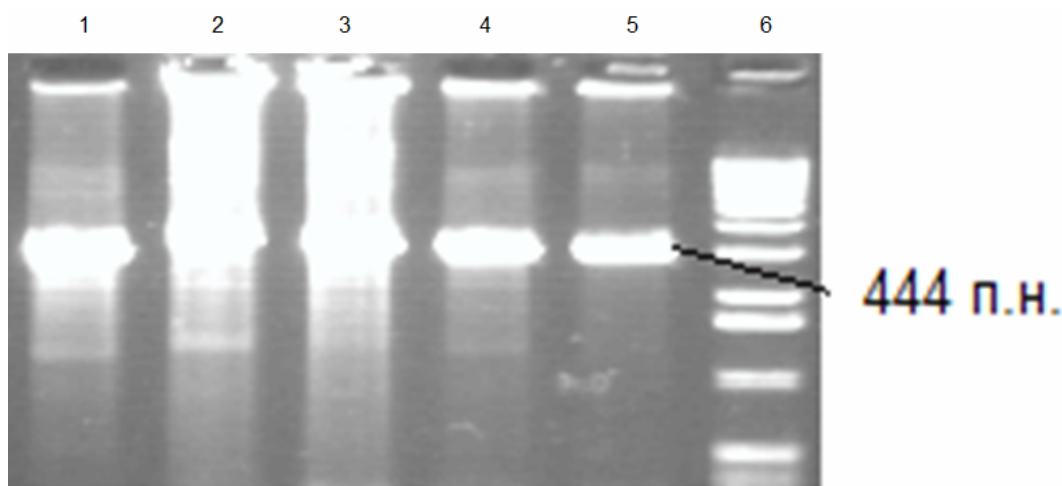


Рис.4. Электрофореграмма в 1,5% агарозном геле продуктов амплификации гена env ВЛКРС; 1-5 - пробы ДНК, 6-я дорожка – маркер

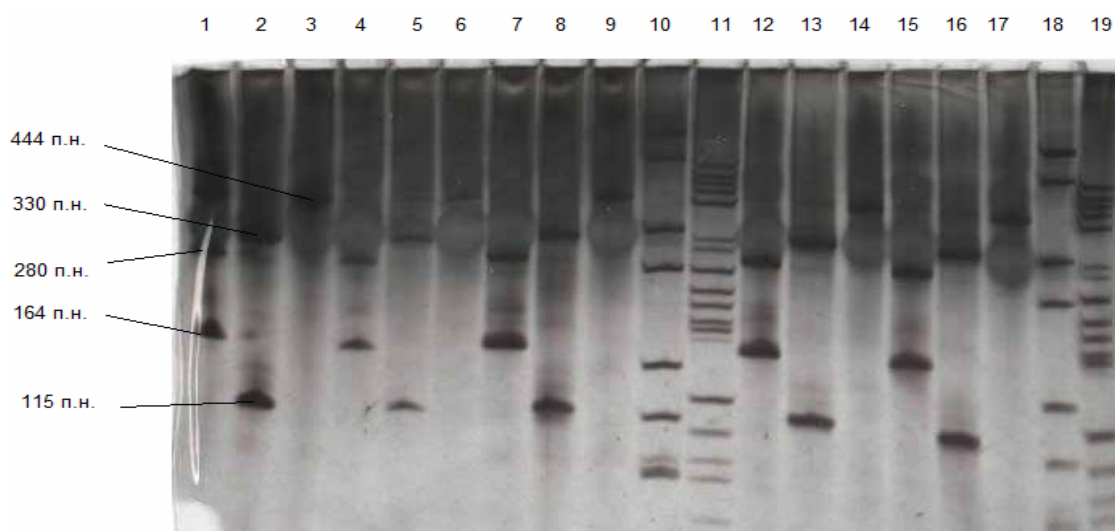


Рис.5. Рестрикционный анализ продуктов амплификации фрагмента гена env провирусной ДНК ВЛКРС длиной 444 п.н. для 5 изолятов ВЛКРС после гнездовой ПЦР с праймерами ENV1-ENV4. Образцы рестрикции получали обработкой ампликонов ферментами рестрикции PvuII, BglI, Bam HI

1-Изолят № 2 обработан PvuII, 2- Изолят № 2 обработан BglI, 3- Изолят № 2 обработан Bam HI, 4- Изолят № 4 обработан PvuII, 5- Изолят № 4 обработан BglI, 6-Изолят № 4 обработан Bam HI, 7- Изолят № 8 обработан PvuII, 8- Изолят № 8 обработан BglI, 9- Изолят № 8 обработан Bam HI, 10- Маркер молекулярной массы, 11- Маркер молекулярной массы, 12- Изолят №12 обработан PvuII, 13- Изолят №12 обработан BglI, 14- Изолят №12 обработан Bam HI, 15- Изолят №9 обработан PvuII, 16- Изолят №9 обработан BglI, 17- Изолят №9 обработан ферментом Bam HI, 18- Маркер молекулярной массы, 19- Маркер молекулярной массы

Анализ представленных на рисунке 5 данных, свидетельствует о том, что образцы полученной рестрикции показывают что: фермент PvuII расщепляет все амплификаты длиной 444 п.н. на два фрагмента -280 и 164 п.н., фермент BglI на фрагменты 330 и 115п.н., а фермент Bam HI фрагментов не образует, что согласно литературным данным характерно для Бельгийского подтипа.

Аналогичная картина рестрикции амплификатов в 444 п.н. этими же рестриктазами получена в работах А.П.Лиманского и др.,(2005), что позволяет отнести вирус лейкоза в обследуемых нами хозяйствах к Бельгийскому подтипу.

Ситуация по лейкозу крупного рогатого скота на территории республики Татарстан остается сложной. Появление в оздоровленных хозяйствах серопозитивных животных, по нашему мнению, связана не только с низкой чувствительностью РИД, но и с разнообразием генотипов вируса лейкоза и высокой вариабельностью его генома.

Работа по генотипированию ВЛКРС в Республике Татарстан нами проведена впервые, и можно быть уверенным, что изучение генотипов вируса позволит усовершенствовать методы борьбы с лейкозом и повысит эффективность противолейкозных мероприятий.

5. Исследование сывороток крови серопозитивных коров на обнаружение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) с провирусной ДНК ВЛКРС

С целью изучения иммунных комплексов в сыворотке крови коров на наличие в них провирусной ДНК было исследовано 38 проб серопозитивных животных.

Иммунные комплексы из сыворотки крови осаждали ПЭГ-6000. Затем проводили изолирование ДНК методом, рекомендованным производителем тест-системы «Лейкоз КРС-провирус», с дальнейшей постановкой ПЦР - метода с праймерами рекомендованными M.Lekursi et al., (2003г).

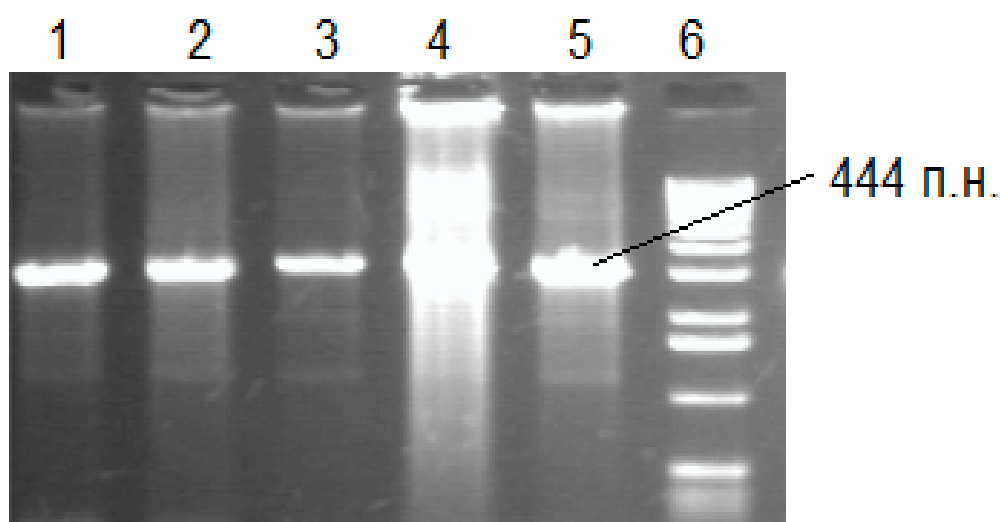


Рис.6. Электрофореграмма в 1,5% агарозном геле продуктов амплификации гена env ВЛКРС; 1-5 - пробы ДНК выделенные из иммунных комплексов, 6-я дорожка – маркер

На рисунке 6 приведена типичная картина электрофореза продуктов амплификации (фрагмент гена env, равный 444 п.н.), свидетельствующая о наличие провирусной ДНК ВЛКРС в ЦИК.

В результате исследований циркулирующих иммунных комплексов получены данные, что в 24 (63%) случаях из 38 проб сыворотки, иммунные комплексы содержат провирусную ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота.

Полученные результаты, свидетельствуют о том, что кроме основного способа распространения вируса лейкоза в организме - путем митоза инфицированных клеток (клональная экспансия), и перезаражения (виремия) существует, вероятно, еще один возможный механизм заражения - внеклеточными провирусными ДНК в составе иммунных комплексов, которые, циркулируя в крови и обладая инфекционностью, проникают в клетки, встраиваются в их геном и запускают репродукцию вируса, что вынуждает организм поддерживать активность иммунного ответа против этого вируса.

Какую еще роль играет внеклеточная провирусная ДНК в виде циркулирующих иммунных комплексов в патогенезе лейкоза крупного рогатого скота - предстоит выяснить.

6. Выявление вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (ВИКРС) среди больных и инфицированных лейкозом коров

Целью исследований является выявление возможной связи между болезнями – иммунодефицитом и лейкозом КРС, а также роли вируса иммунодефицита в патогенезе лейкоза крупного рогатого скота.

Выделенные из цельной крови КРС образцы четырех скотоводческих хозяйств четырех районов РТ, СХПК «Каргуза» (В-Услонский район)-12 образцов, СХПК «Правда» (Высокогорский район)-34 образца, СХПК «им. Ленина» (д.Нурлаты, Зеленодольского района)-22 образца, ООО «БахетлеАгро» ф-ал «Шингальчи», (Нижекамский район)- 28 образцов были исследованы в ПЦР с использованием праймера на env -ген рекомендованной M.Lekursi et al., (2003 г.) для выявления ВЛКРС.

Всего исследовано 96 проб крови, из которых 91 проба – кровь коров, и 5 проб крови телят, в том числе 36 проб РИД положительные на лейкоз, 55-РИД отрицательно реагирующие на вирус лейкоза КРС, 5 проб крови телят 15-20 дневного возраста, не исследованные серологически (табл.7).

Эти пробы исследовали на наличие провирусной ДНК вируса иммунодефицита КРС, пользуясь методическим приемом О.Ю. Лиманской и др.,(2005), применяя праймер ВIV1 - ВIV2 для детекции фрагмента гена pol провирусной ДНК ВИКРС, который дает при амплификации продукт с молекулярной массой 101 п.н. (рис.7):

ВIV1 (2343-2366) 5'gAATgTgAACACTTACTgCAATA-3'

ВIV2 (2442-2422) 5'AATCTCggACTACAgAgATCCgAC-3'

Праймеры синтезированы фирмой «Литех»(Россия).

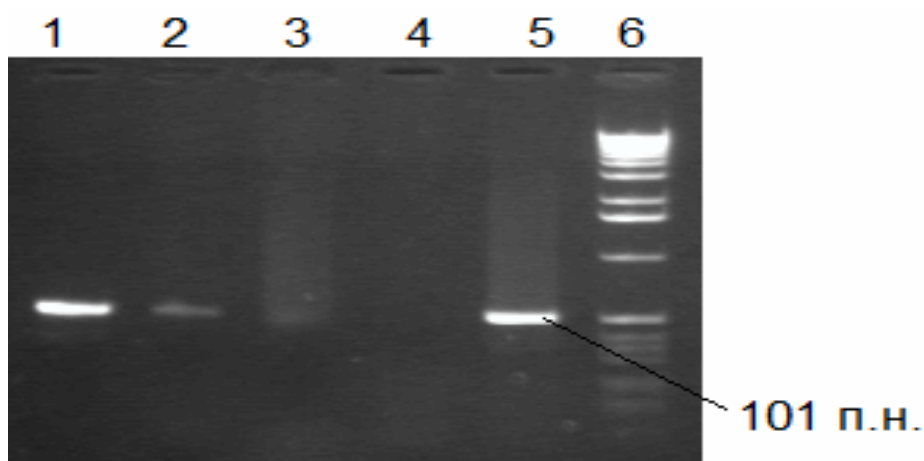


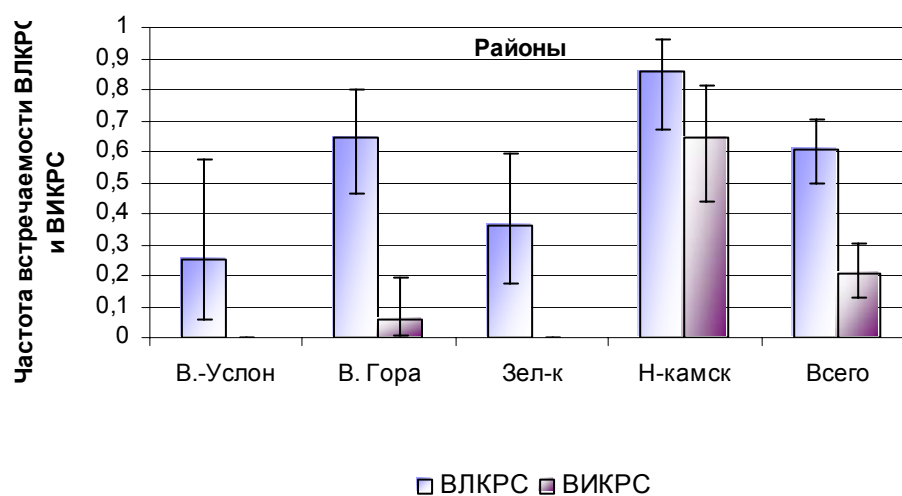
Рис.7. Электрофореграмма образцов ДНК в 1,5 % агарозном геле: 1-5 - пробы ДНК; 6 – маркер.

Табл.7.

Выявление вируса иммунодефицита крупного рогатого скота у больных лейкозом коров в республике Татарстан

№ п.п	Исследуемый район	Кол-во проб	Результаты ПЦР (+) ВЛКРС	Результаты ПЦР (+) ВИКРС	Частота коинфицированности (ВЛКРС и ВИКРС), %.
1	В-Услонский	12	3 (25 %)	0 (0 %)	0
2.	Высокогорский	34	22 (64 %)	2 (5 %)	9
3.	Зеленодольский	22	8 (36 %)	0 (0 %)	0
4.	Нижнекамский	28	24 (85 %)	18 (64 %)	75
5	ИТОГО	96	58 (60 %)	20 (20 %)	34

Примечание: ВЛКРС – вирус лейкоза крупного рогатого скота
ВИКРС – вирус иммунодефицита крупного рогатого скота.



Примечание: Пробы В-Услонского и Зеленодольского районов ПЦР (-) на ВИКРС
Рис.8. Результаты исследований проб крови на ВИКРС методом ПЦР, основанные на показателях 95% доверительного интервала.

По результатам исследований из таблицы 7 и рисунка 8, видно, что в Нижнекамском районе в 75% случаях ВИКРС выявляется у животных инфицированных лейкозом КРС. А частота встречаемости ВИКРС на фоне ВЛКРС в Высокогорском районе 9%. В среднем частота встречаемости вируса иммунодефицита на фоне лейкоза составляет 34%.

Как видно по результатам опытов (рис.8) (Высокогорский и Нижнекамский районы) в двух хозяйствах выявлены животные коинфицированные ВИКРС и ВЛКРС. Были обнаружены животные, зараженные обоими вирусами, или одним из них, или свободные от инфекции обоими вирусами. В двух хозяйствах выявлен высокий процент инфицированных ВЛКРС животных (64 и 85%), в одном хозяйстве провирус ВИКРС обнаружен у 64% исследованных животных. С применением метода ПЦР провирусная ДНК вируса лейкоза КРС обнаружена в 58 из 96 исследованных проб, включая и пробы крови телят (5 проб), и в 20-ти пробах, включая две пробы крови телят из этих 96, обнаружена провирусная ДНК вируса иммунодефицита КРС (что составляет 20%). Следует отметить, что ПЦР отрицательные на ВЛКРС пробы крови, также отрицательно реагировали на ВИКРС, а также пробы двух исследуемых районов (В-Услонский и Зеленодольский районы) оказались свободными от иммунодефицита крупного рогатого скота.

Проведенные исследования позволили впервые в России выявить вирус иммунодефицита крупного рогатого скота в хозяйствах республики Татарстан и предположить, что эти инфекции сопутствуют друг другу.

Наши данные получили подтверждение в исследованиях В.В. Колотвина (2007) который показал, что в хозяйствах Московской области распространен вирус иммунодефицита крупного рогатого скота.

Необходимы дополнительные исследования с использованием вирусологических, иммунологических и молекулярно – генетических методов для определения роли вируса иммунодефицита в патогенезе лейкоза крупного рогатого скота.

Заключение.

В заключении следует отметить, что для выявления истинной картины эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах, недостаточно использование только серологических и гематологических методов исследований, необходимо также применение полимеразной цепной реакции, которая позволяет обнаруживать вирус у РИД – отрицательных животных и что особенно ценно – определять инфицированность телят с 15-ти дневного возраста.

Следует подчеркнуть, что проблема лейкоза крупного рогатого скота остается сложной из-за особенностей этой инфекции. Она развивается медленно, и основной метод в борьбе с ней – ранняя диагностика и изолированное содержание инфицированных животных, изолированное выращивание инфицированного молодняка и своевременное изъятие их из

здорового стада. На практике эти условия не всегда выполнимы, допускается передержка инфицированных животных, нарушения правил оздоровления хозяйств от лейкоза крупного рогатого скота, что ведет к увеличению сроков ликвидации этой инфекции.

Требует дальнейшего изучения природа возбудителя. Молекулярно – генетические исследования последних лет показали, что ВЛКРС подвергается мутациям и в настоящее время определено 6 генотипов этого вируса (А. П. Лиманский и др., 2005; Е.В. Дробот, 2007). Нашими исследованиями показано, что в хозяйствах Республики Татарстан циркулирует Бельгийский подтип вируса. Знание особенностей этих подтипов позволят организовать более эффективные меры борьбы с лейкозом крупного рогатого скота.

Нами впервые выявлена провирусная ДНК ВЛКРС в циркулирующих иммунных комплексах сыворотки крови, что ставит новые вопросы о механизме передачи вируса.

Необходимо учесть, что наши знания о природе болезни, о патогенезе лейкоза недостаточны. Так, работами последних лет установлено, что вирусу лейкоза сопутствует вирус иммунодефицита (ВИКРС). Циркуляция вируса иммунодефицита у крупного рогатого скота, инфицированных лейкозом в нашей стране впервые установлена нами (2006) и это подтверждено работами В.В. Колотвина (2007). Изучение роли ВИКРС в патогенезе лейкоза требует дальнейших исследований.

Благодаря применению молекулярно – генетических методов в изучении ВЛКРС стало возможным значительно углубить и расширить наши знания о природе возбудителя, усовершенствовать методы диагностики, что безусловно позволит более успешно вести противолейкозные мероприятия и сократить сроки оздоровления хозяйств от этой инфекции.

Наши исследования по ПЦР -диагностике выполнялись по согласованию с ГУВ КМ РТ в хозяйствах, оздоравливаемых в соответствии с целевой программой по профилактике и ликвидации лейкоза крупного рогатого скота, и результаты использовались в оперативной работе ветеринарной службы Республики Татарстан.

ВЫВОДЫ

- 1. Подобраны видоспецифические праймеры на env-gen для ПЦР диагностики лейкоза крупного рогатого скота (Внешние праймеры (фрагмент 598 п.н.): env₅₀₃₂ (5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3'), env₅₀₉₉(5'-CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT-3'); Внутренние праймеры (фрагмент 444 п.н.): env₅₅₂₁ (5'-GCGAGGCCGGTCCAGAGCTGG-3'), env₅₆₀₈(5'-AACAACAACCTCTGGGAAGGGT-3')), для изолятов выделенных на территории Республики Татарстан, чувствительность которых, в среднем на 26% выше, чем тест - система фирмы «АмплиСенс» и на 9 % выше чем тест - система (gag) «Биоком».
- 2. Показано что для диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота может быть использована цельная кровь, сыворотка крови,

молоко, а так же пробы крови телят с 15-ти дневного возраста. Установлено, что ПЦР анализ обеспечивает более полное выявление зараженных животных.

- 3. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ анализ) изолятов из неблагополучных по лейкозу хозяйств показал, что в хозяйствах Республики Татарстан циркулирует Бельгийский подтип вируса лейкоза КРС.
- 4. Установлено, что в составе циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), выделенных из сыворотки крови инфицированных лейкозом животных обнаружена провирусная ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота.
- 5. Выявлено наличие провирусной ДНК вируса иммунодефицита крупного рогатого скота в крови у инфицированных лейкозом животных, где средним частота встречаемости вируса иммунодефицита на фоне ВЛКРС составляет 34%.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Результаты исследований по диагностике лейкоза крупного рогатого скота использованы при составлении целевой программы по профилактике и ликвидации лейкоза крупного рогатого скота в Республике Татарстан на 2006-2010 годы, где предложен ПЦР метод диагностики инфекции и типизация вируса.

5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Камалов Б.В. Лейкоз крупного рогатого скота / Б.В. Камалов, **Ф.Ф. Зиннатов**, Н.З. Хазипов, А.Х. Волков // Методическое пособие. -Казань, 2005. – 47 с.

2. **Зиннатов Ф.Ф.** Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в диагностике лейкоза крупного рогатого скота / **Ф.Ф. Зиннатов**// материалы симпозиума ФГОУ «ФЦТРБ – ВНИВИ». -Казань, 2005. –С. 149-151.

3. Хазипов Н.З. Обнаружение вируса иммунодефицита крупного рогатого скота у больных лейкозом коров в республике Татарстан. / Н.З.Хазипов, Г.Ф. Кабиров, **Ф.Ф. Зиннатов**, Р.П. Тюрикова // Материалы Всероссийской научно – исследовательской конференции. -Казань, 2006. –С. 59-61.

4. **Зиннатов Ф.Ф.** Детекция провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота посредством полимеразной цепной реакции /**Ф.Ф. Зиннатов**// -Ижевск, 2006.- С. 42-46.

5. Хазипов Н.З. Генодиагностика лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)/ Н.З. Хазипов, Г.Ф. Кабиров, **Ф.Ф. Зиннатов**, Р.П. Тюрикова// Материалы Всероссийской научно – исследовательской конференции, «КГАВМ». -Казань, 2006.-С. 61-62.

6. Хазипов Н.З. Обнаружение вируса иммунодефицита крупного рогатого скота у больных лейкозом коров в республике Татарстан/ Н.З.Хазипов, Г.Ф.

Кабилов, **Ф.Ф. Зиннатов**, Р.П. Тюрикова// Ученые записки КГАВМ.-2006.-Т. 182.-С. 335-339.

7.Гибадулина И.Р.Обнаружение провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота в молоке методом ПЦР / И.Р. Гибадулина, **Ф.Ф. Зиннатов**// Материалы Всероссийской научно – исследовательской конференции, -Ижевск ,2006. –С. 31-35.

8.Камалов Б.В. Лейкоз крупного рогатого скота /Б.В. Камалов, **Ф.Ф. Зиннатов**, Н.З. Хазипов, А.Х. Волков, И.Н. Никитин, С.П. Сыромолот // Методическое пособие -Казань, 2006. – 94 с.

9.**Зиннатов Ф.Ф.**Типирование вируса лейкоза крупного рогатого скота / **Ф.Ф. Зиннатов**, И.Р. Гибадулина, Н.З. Хазипов, Р.П. Тюрикова, Б.В. Камалов//Ученые записки КГАВМ.-2006.-Т.189.-С. 71-78.

10.Гибадулина И.Р. Использование метода полимеразной цепной реакции для диагностики лейкоза крупного рогатого скота/ И.Р. Гибадулина, **Ф.Ф. Зиннатов**// Материалы международной студенческой научной конференции, «Энтузиазм и творчество студентов в развитии науки».-Троицк,2007.- С. 53-57.

11. Хазипов Н.З. Выявление провируса лейкоза крупного рогатого скота в крови и молоке методом ПЦР / Н.З. Хазипов, **Ф.Ф. Зиннатов**, И.Р. Гибадулина, Р.П. Тюрикова// Материалы Всероссийской научно – исследовательской конференции, -Оренбург,2007. –С. 78-79.

12.**Зиннатов Ф.Ф.** Генотипирование вируса лейкоза крупного рогатого скота// **Ф.Ф. Зиннатов**, И.Р. Гибадулина, Н.З. Хазипов, Р.П. Тюрикова, Б.В. Камалов// Материалы Всероссийской научно – исследовательской конференции, «КГАВМ». -Казань,2007. –С. 17-19.

13.Якупов Т.Р. Метод ИФА в диагностике лейкоза крупного рогатого скота/ Т.Р. Якупов, В.А. Кокорев, **Ф.Ф. Зиннатов**, А.Х. Волков// Материалы международной студенческой научной конференции «Энтузиазм и творчество студентов в развитии науки». -Троицк,2007. – С. 255-258.

14.**Зиннатов Ф.Ф.** Детекция и типизация вируса лейкоза крупного рогатого скота/ **Ф.Ф. Зиннатов**, И.Р. Гибадулина, Н.З. Хазипов, Р.П. Тюрикова, Б.В. Камалов.//Специальный выпуск, материалы Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной биохимии», посвященной 20-летию Кировской государственной медицинской академии, - Киров,2007. – С. 48-50.

15.**Зиннатов Ф.Ф.** Молекулярная диагностика вируса лейкоза крупного рогатого скота./ **Ф.Ф. Зиннатов**, И.Р. Гибадулина, Н.З. Хазипов, Р.П. Тюрикова, Б.В. Камалов // Материалы Всероссийская научно-практической конференции с международным участием. -Москва,2007.- С. 81-82.

16.Хазипов Н.З.Внеклеточная провирусная ДНК лейкоза крупного рогатого скота в патогенезе этой инфекции / Н.З. Хазипов, Р.П. Тюрикова, Т.Р.Якупов, **Ф.Ф. Зиннатов**, Б.В. Камалов// Материалы Конференции «IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов».-Новосибирск,2008.- С. 505.

17. **Зиннатов Ф.Ф.** Индикация провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота посредством полимеразной цепной реакции /**Ф.Ф.Зиннатов**// Ветеринарный врач. – 2008.-№2.-С. 16-18.

18. Хазипов Н.З. Внеклеточная провирусная ДНК лейкоза крупного рогатого скота и ее роль в патогенезе этой инфекции /Н.З.Хазипов, **Ф.Ф.Зиннатов**, Т.Р.Якупов, Б.В. Камалов, Р.П. Тюрикова// Ученые записки КГАВМ.-2008. –Т.192. - С. 161-164.

Контакт:

E-mail: ffzinnatov@mail.ru