

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЦР И ИХА ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ И ЛЕЙКОЗОВ ЖИВОТНЫХ

Е.С. КРАСНИКОВА, В.А. АГОЛЬЦОВ, А.А. ЩЕРБАКОВ, О.Е. СЕМЁНОВА

**КРАСНИКОВА Екатерина Сергеевна** – доцент кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», кандидат биологических наук

**АГОЛЬЦОВ Валерий Александрович** – профессор кафедры паразитологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», доктор ветеринарных наук, старший научный сотрудник

**ЩЕРБАКОВ Анатолий Анисимович** - профессор кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», доктор ветеринарных наук

**СЕМЁНОВА Ольга Евгеньевна** - аспирант кафедры паразитологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ»

*Адрес: Театральная площадь, 1, г. Саратов, РФ, 410012. Тел. +7(917)313-11-34. E-mail: [krasnikova\\_es@mail.ru](mailto:krasnikova_es@mail.ru); [kafmikrobiol@mail.ru](mailto:kafmikrobiol@mail.ru); [Agoltsov-Saratov@yandex.ru](mailto:Agoltsov-Saratov@yandex.ru)*

**Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция, ПЦР, иммунохроматография, ИХА, вирусный иммунодефицит, лейкоз, кошки, крупный рогатый скот, диагностика.

В статье приводится обоснование целесообразности применения метода молекулярной диагностики - полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени - для выявления животных, инфицированных вирусом иммунодефицита и лейкоза как более эффективного в сравнении с методом иммунохроматографического анализа (ИХА). Библ. 8. Рис. 2.

В настоящее время регистрируется огромное количество инфекционных заболеваний, как у животных, так и у людей. Производители диагностических тест-систем предлагают ряд методов для выявления возбудителей или признаков их жизнедеятельности в организме. Это и классические методы прямого выделения возбудителей болезней, которые подчас трудоемки и не всегда возможны, особенно при вирусных инфекциях, и опосредованные методы, позволяющие выявлять антитела к антигенам (РИД, РИФ, ИФА, РИА и др.), а также новейшие молекулярно-генетические диагностические исследования [2, 3, 8].

В последнее время широко применяется метод прямого обнаружения генома возбудителя в исследуемом материале – полимеразная цепная реакция (ПЦР) и серологические методы экспресс-диагностики, такие как иммунохроматографический анализ (ИХА) [3, 4, 7, 8].

ПЦР - метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале [2].

ИХА можно условно отнести к группе реакций с мечеными антителами. При этом в качестве метки используют окрашенный латекс или частицы коллоидного золота [7].

В наших предыдущих публикациях было наглядно показано преимущество ПЦР в сравнении с РИД при выявлении животных, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС). Напомним, что выявляемость инфицированных ВЛ КРС в ПЦР в наших исследованиях была в 1,7 раза выше, чем в с РИД, что сопоставимо с результатами, полученными и другими учеными [2].

**Целью данных исследований** явилось сравнение диагностической ценности иммунохроматографического анализа и полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени при вирусных иммунодефицитах сельскохозяйственных и непродуктивных животных, а также выявление корреляционной связи между носительством вирусов иммунодефицита и лейкоза.

**Материалы, объекты и методы исследований.** В качестве модели для своих исследований мы избрали вирусный иммунодефицит кошек (ВИК) как наиболее распространённое вирусное заболевание кошачьих [2, 7]. Важным критерием выбора являлось также и то, что диагностировать это заболевание можно параллельно несколькими методами с применением сертифицированных тест-систем.

Для экспресс-диагностики ВИК определяли антитела к р24 антигену вируса в сыворотке и плазме крови инфицированных животных методом ИХА с использованием набора Rapid FIV Ab. Тот же материал исследовали методом ПЦР с использованием наборов «ВИК» и «Лейкис» для диагностики вирусного иммунодефицита и лейкоза кошек с детекцией в режиме реального времени.

Исследование крупного рогатого скота на носительство ВЛКРС осуществляли методом ПЦР с помощью набора «Лейкоз». Носительство бычьего вируса иммунодефицита (БИВ) определяли с помощью набора ПЦР-Микс с использованием праймеров gag и pol к соответствующим последовательностям генома вируса. Олигонуклеотидные последовательности и условия реакции были подобраны на основании исследований Колотвина В.В. [3].

Параллельно методами иммунохроматографии и полимеразной цепной реакции было исследовано 30 проб крови от кошек и котов, поступивших в клинику «Ветеринарный госпиталь» ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ» с различными патологиями.

**Результаты исследований.** По результатам серологических исследований методом ИХА было установлено, что 23,3% обследованных животных являлись носителями ВИК. Результаты молекулярно-генетических исследований методом ПЦР показали наличие провирусной ДНК у 60% пациентов «Ветеринарного госпиталя» (рисунок 1). У всех животных, положительно реагирующих в ПЦР на наличие ВИК, диагноз был подтвержден гематологическими исследованиями. Кроме того, после проведения специфической терапии иммунодефицита у животных наступал период ремиссии.

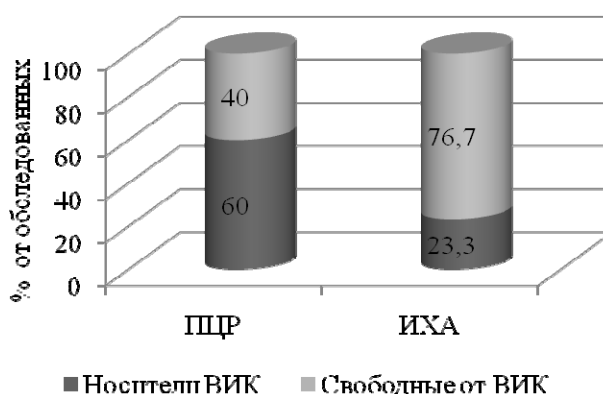


Рисунок 1. Количество носителей ВИК, выявленных методами ПЦР и ИХА

Заключительным этапом наших исследований стало выявление корреляции между заболеваемостью крупного рогатого скота и кошек вирусным иммунодефицитом и лейкозом.

Для этого методом ПЦР на наличие провирусов данных возбудителей было исследовано 42 пробы крови от подозрительных в заболевании кошек и 161 проба от крупного рогатого скота (121 проб из ООО «Ягоднополянское» и 40 проб из ПХ «Краснокутский зооветтехникум»). Результаты исследований отражены на рисунке 2.

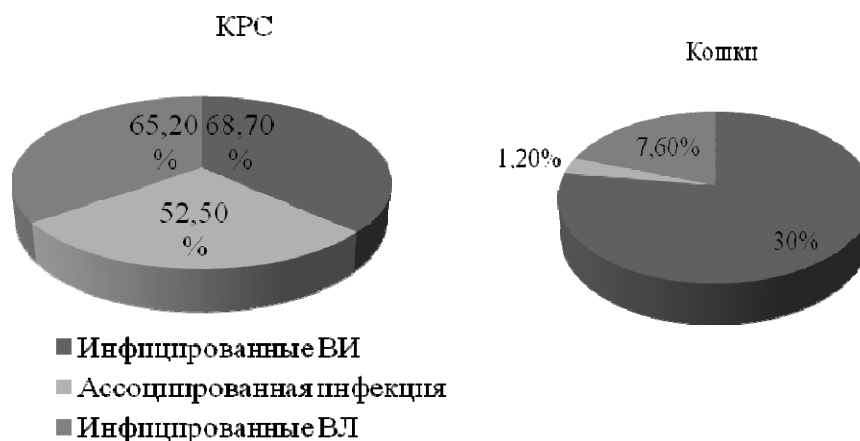


Рисунок 2 - Результаты обследования животных на носительство вирусов иммунодефицита (ВИ) и лейкоза (ВЛ).

Представленные на рисунке 2 результаты исследований свидетельствуют о том что, носительство вирусов в отдельности, как и ассоциированное инфицирование, у крупного рогатого скота выражено в большей степени, чем у кошек. Это в первую очередь может быть связано с тем, что исследованию были подвергнуты животные неблагополучных стад, где на протяжении последних лет имели место энзоотические случаи выявления больных лейкозом животных.

Таким образом, результаты проведенных исследований и анализа литературных данных позволяют сделать следующие **выводы**:

1. Вирусные иммунодефициты имеют широкое распространение в Саратовской области, как среди кошек, так и среди крупного рогатого скота ООО «Ягоднополянское» и ПХ «Краснокутский зооветтехникум».

2. По чувствительности молекулярно-генетический метод (ПЦР) более чем в 2,5 раза превосходит серологический метод (ИХА).

3. Высокая чувствительность ПЦР с детекцией в режиме реального времени позволяет на настоящий момент отнести этот метод диагностики к наиболее высокочувствительным, специфичным и достоверным методам.

#### Литература.

1. Бажибина, Е.Б. Частные случаи дифференциальной диагностики кошачьих инфекций /Е.Б. Бажибина //Труды московского международного ветеринарного конгресса.- М., 2011. - С. 97-99.
2. Агольцов В.А. Сравнительная диагностическая оценка серологического и молекулярно-генетического методов лабораторных исследований на лейкоз крупного рогатого скота./ В.А. Агольцов, Е.С. Красникова, А.А. Щербаков, П.С. Мелкина, Е.А. Горельникова, Н.А. Дружаева //«Вестник Алтайского государственного аграрного университета». – 2012. - №4 (90). – С. – 56 – 59.
3. Колотвин В.В. Выявление вируса иммунодефицита КРС в Московской области/В.В. Колотвин, А.В. Капитонов, Н.Ф. Гриненко и др. //Рос. вет. журн. с.-х. животные. -2006. -№ 2.- С. 18-20.
4. Красникова Е.С. Вирусные иммунодефициты сельскохозяйственных и мелких домашних животных /Е.С. Красникова, А.В. Красников //Актуальные проблемы ветеринарной патологии, физиологии, биотехнологии, селекции животных. Современные технологии переработки сельскохозяйственной продукции /Сборник материалов научно-практической конференции 1-5 февраля 2010.-Саратов, 2010. –С. 40-42.
5. Красникова Е.С. Энзоотическая ситуация по вирусному иммунодефициту крупного рогатого скота в городе Саратове и Саратовской области./ Е.С. Красникова//Вестник Ветеринарии, вып. 59, N 4/2011. С.-70-72.
6. Красникова Е.С. Ретроспективный анализ заболеваемости вирусом иммунодефицита крупного рогатого скота./Е.С. Красникова// Материалы научно-практических конференций специализированной агропромышленной выставки САРАТОВ – АГРО. 2011. (1-3 ноября 2011 г.)- С. - 34-36.
7. Энзоотология вирусного иммунодефицита кошек в городе Саратове и Саратовской области /Е.С. Красникова, А.В. Анников// Вестник Ветеринарии, вып. 59, N 4/2011. С.-99-101.
8. Чандлер Э.А. Болезни кошек/Э.А. Чандлер, К.Дж. Гаскелл, Р.М. Гаскелл.-АКВАРИУМ ЛТД.- 2002.- С. 179, 462-478.

UDC: 616-07.616.9.619.

#### **THE COMPARATIVE ANALYSIS OF APPLICATION BY REAL TIME POLIMERAZ CHAIN REACTION AT DIAGNOSTICS OF VIRAL IMMUNODEFICIENCIES AND LEUKOSIS OF ANIMALS**

KRASNIKOVA Ekaterina S. – Lecturer of Federal State Educational Institution of Higher Education «Saratov State Agrarian University», Candidate of Biological Sciences

Address: 359-213, B. Gornaya Street, Saratov, Russia, 410005. Tel. +7(917)313-11-34. E mail: krasnikova\_es@mail.ru

AGOLTSOV Valery A. – Professor of Federal State Educational Institution of Higher Education «Saratov State Agrarian University», Doctor of veterinary sciences. Agoltsov-Saratov@yandex.ru

SHCHERBAKOV Anatoly A. - Professor of Federal State Educational Institution of Higher Education «Saratov State Agrarian University», Doctor of veterinary sciences. kafmikrobiol@mail.ru

SEMYONOVA Olga Evgenyevna - Postgraduated student of Federal State Educational Institution of Higher Education «Saratov State Agrarian University». Agoltsov-Saratov@yandex.ru

Key words: polymerase chain reaction, immunohromatografy, viral immune deficiency, leukosis, cats, cattle, diagnostics.

Data about the author:

Summary: The article contains the justification of expediency of application of the method of molecular diagnostics - real time polymerase chain reaction, for identification of the animals infected with the immunodeficiency virus and leukemia virus. The widespread of viral immunodeficiencies and leucosis on the territory of the Sartor city and Sartor aria is shown. It has been established that the sensitivity of PCR in more than 2.5 times higher than the sensitivity of IHA. The efficiency of PCR for the diagnostics of this infections at any stage of infection is proved. III. 2. Ref. 8.

**BIBLIOGRAPHIC REFERENCES:**

1. Bagibina E.B. Special cases of differential diagnostics of the cat's infections/E.B.Bagibina //Works of the Moscow international veterinary congress. - M, 2011. - P. 97-99.
2. Agoltsov V.A. Comprehensive diagnostic evaluation of serological and molecular-genetic methods of laboratory researches on bovine leukosis./ V.A. Agoltsov, E.S. Krasnikova, A.A. Shcherbakov, P.S. Gorelnikova, N.A. Druzhayeva//Vestnik of the Altai state agrarian University.
3. Kolotvin V.V. Identification of immunodeficiency virus of cattle in the Moscow region/V.V.Kolotvin, A.V.Kapitonov, N.F.Grinenko, etc.//Ros.vet. J. Agricultural animals. -2006. - № 2 .- P. 18-20.
4. Krasnikova E.S. Viral immunodeficiency agricultural and small domestic animals/E.S. Krasnikova, A.V. Krasnikov//Actual problems of veterinary pathology, physiology, biotechnology, animal breeding. Modern technologies of processing agricultural products/Proceedings of the Scientific Conference 1-5 February 2010.-Saratov, 2010. -C. 40-42.
5. Krasnikova E.S. An epizootology situation on a virai immunodeficiency of cattle in the Saratov city and Saratov region /E.S. Krasnikova// Vestnik veterinarii, vol. 59, N 4/2011. Page-70-72.
6. Krasnikova E.S. Retrospective analysis of incidence of cattle by viral immunodeficiency./E.S. Krasnikova// Materials of scientific-practical conferences of specialized agricultural exhibition SARATOV - AGRO. 2011. (November 1-3, 2011). – P.- 34-36.
7. Epizootology of felin immunodeficiency virus in the Saratov city and Saratov region/E.S. Krasnikova// Vestnik veterinarii, vol. 59, N 4/2011. –P. 99-101.
8. Chandler A.A. Diseases of cats/A.A. Chandler, K.G. Gaskell, R.M. Gaskell.- AKVARIUM LTD. - 2002. - P. 179, 462-478.