

УДК 616:619

## ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ВИСНА-МАЭДИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

*Антошкин П.А., Воротников А.П., студенты 5 курса факультета  
ветеринарной медицины и биотехнологии*

*Научные руководители – Васильева Ю.Б.<sup>1</sup>, кандидат  
ветеринарных наук, доцент;*

*Барышникова Е.И.<sup>2</sup>, кандидат биологических наук, заведующая  
лабораторией;*

*Колбасова О.Л.<sup>2</sup>, кандидат биологических наук, доцент, ведущий  
научный сотрудник*

*ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА<sup>1</sup>*

*ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии<sup>2</sup>*

**Ключевые слова:** ПЦР, вирус Висна-Маэди, лабораторная диагностика

*В статье приводятся результаты проведения диагностики  
вируса Висна-Маэди молекулярно-генетическим методом.*

ПЦР и ее модификации обоснованно дополняют серологические методы исследования, особенно на ранних стадиях развития заболевания [1].

На сегодняшний день разработаны и используются в практике следующие варианты ПЦР для выявления генома вируса Висна-Маэди: гнездовая и ОТ-ПЦР, ПЦР-РВ, ПЦР in situ, гнездовая ПЦР на env-ген. Используя ПЦР-РВ и ИФА, ученые установили наличие лентивирусов в семени, половых органах и железах баранов [2].

Научный эксперимент проводился на базе ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии в лаборатории Ретровирусных инфекций животных.

Для лабораторной диагностики ЛМЖ до начала сероконверсии наиболее широко используемым методом является ПЦР с электрофоретической детекцией [2-7]. Данные реакции являются универсальными инструментами молекулярной биологии, позволяющими ставить предварительный диагноз в кратчайшие сроки и с высокой точностью. Амплификацию проводили на приборе PalmCycler. Реакционная смесь

содержала следующие компоненты: смесь праймеров VVMFw и VVM-Rev (10 pM каждого)-2,0  $\mu$ l , dNTP (25 mM) - 0,5  $\mu$ l , MgCl<sub>2</sub> (25 mM)- 0,5  $\mu$ l, 5x буфер для ПЦР (Амплисенс Blue)- 5  $\mu$ l, Taq ДНК-полимераза- 1  $\mu$ l, провирусная ДНК(исследуемый образец) – 5  $\mu$ l , деионизированная вода - до 25  $\mu$ l.

Смесь перемешивали на смесителе типа «Vortex», капли со стенок осаждали центрифугированием в течение 5-10 сек. Амплификацию проводили при следующих оптимальных режимах:

94°C – 3 мин	} 35 циклов
94°C – 20 сек	
50°C – 20 сек	
72°C – 20 сек	
72°C – 5 мин	

В каждой серии анализов использовали контрольные образцы: положительный контроль (референс-штамм вируса АЭК 75G-63) и отрицательный контроль. Смеси для контрольных образцов готовили по той же прописи, что и для исследуемых образцов.

Анализ ПЦР-продуктов осуществляли при помощи электрофореза в 2,0 % агарозном геле, для приготовления которого смешали 2 г агарозы и 100 мл 1x TBE буфера. Смесь помещали в микроволновую печь и доводили до кипения. Далее, в смесь добавили 10  $\mu$ l бромистого этидия и тщательно перемешали. Гель разливали в форму и установили гребенки. В образовавшиеся в застывшем геле лунки вносили по 10  $\mu$ l ПЦР - продукта, в последнюю лунку ряда вносили 5  $\mu$ l маркера молекулярной массы («Fermentas», Латвия). Электрофорез проводили при напряжении 8 В/см длины геля в течение 20 мин.

Результаты электрофореза учитывали на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Амплифицированные фрагменты ДНК появлялись в виде светящихся оранжевых полос в треках с исследуемыми образцами относительно фрагмента в пробе положительного контроля. С помощью маркера молекулярной массы определяли размеры исследуемых фрагментов ДНК. Для сохранения результатов реакции использовали трансиллюминатор.

В результате проведения ПЦР с электрофоретической детекцией нами выявлены положительные пробы: АЭК штамм 75G-63. Специфический продукт амплификации размером 213 п.о., фланкирующий участок env-гена.

Таким образом, ПЦР перспективна для диагностики Висна-Маеди.

---

*Библиографический список*

1. Васильева, Ю.Б. Конструирование биопрепаратов для лабораторной диагностики бордетеллёзной инфекции / Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №2 (22). – С. 25-29.
2. Васильева, Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №3 (23). С. 46-51.
3. Мاستиленко А.В. Разработка системы дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «Реального времени» / А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, О.Ю. Борисова, Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – №1(25). – С. 50-54.
4. Мاستиленко, А.В. Определение эффективности разработанных зондов в реакции ОТ–ПЦР для повышения специфичности выявления *Bordetella bronchiseptica* / А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Д.Г. Сверкалова // Инфекция и иммунитет. - 2013. - Т. III. - № 2. - С. 152.
5. Нафеев, А.А. Вопросы эпидемиолого-эпизоотологического надзора за зоонозными инфекциями / А.А. Нафеев, Н.И. Пелевина, Ю.Б. Васильева // Дезинфекционное дело. - 2014. - № 1. - С. 39-43.
6. Vasylyeva, Yu.B. Selection of the complex of microbiological tests for *Bordetella bronchiseptica* typing / Yu.B. Vasylyeva / Вестник Орловского государственного аграрного университета. - 2013. - Т. 43. - № 4. - С. 44-46.
7. Vasylyeva, Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multyplex format / Yu.B. Vasylyeva / Вестник Орловского государственного аграрного университета. - 2013. - Т. 45. - № 6. - С. 81-85.

## THE DETECTION OF THE VIRUS VISNA-MAEDI MOLECULAR GENETIC METHOD

*Antoshkin, P.A., Vorotnikov A.P.*

**Key words:** PCR, virus *Visna-Maedi*, laboratory diagnosis

*The article presents results of diagnostics of virus *Visna-Maedi* molecular genetic method.*