

УДК 636.2:619:579:373.167.1

ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ЭКСПЕРТИЗА МЯСА КРОЛИКОВ ПРИ ПАСТЕРЕЛЛЕЗЕ

*Сатдарова Д.Г., студентка 4 курса ФВМиБ
Научные руководители: Синдякова Н.П., кандидат
биологических наук, заведующая лабораторией, ГНУ ВНИИВВиМ
Васильева Ю.Б., кандидат ветеринарных наук, доцент;
Журавская Н.П., кандидат биологических наук, старший
преподаватель
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА*

Ключевые слова: ПЦР, пастереллез, оптимизация.

В последние годы, изучение проблем, связанных с пастереллезом кроликов в РФ, необоснованно снижено.

Так как в настоящее время надежных методов ранней диагностики пастереллеза кроликов пока еще не разработаны, болезнь продолжает оставаться губительной в кролиководстве, поэтому разработка методов ранней диагностики заболевания является актуальной научной проблемой.

Одним из инструментов в диагностике инфекционных заболеваний является метод ПЦР. При помощи этой реакции появилась возможность выявлять возбудителя на любой стадии болезни, включая латентную, что позволяет значительно сократить время на постановку диагноза.

Целью данной работы являлось изучение возможности применения полимеразной цепной реакции для лабораторной диагностики пастереллеза кроликов, а также оптимизация условий постановки ПЦР реакции.

Пастереллез (геморрагическая септицемия) - остро, подостро или хронически протекающая инфекционная болезнь сельскохозяйственных, диких животных, в том числе - птиц.

В работе была использована ДНК, выделенная из органов от мыши, зараженной изолятом № 08615 *P. multocida*, серотип В.

В качестве материала для выделения ДНК были использованы следующие органы: селезенка, легкие, трахея.

В качестве отрицательных контролей использовали образцы органов и тканей от клинически здоровых интактных животных, а также образцы патологического материала.

Для проведения ПЦР реакции нами были использованы следующие праймеры (табл.1).

Таблица 1 - Перечень праймеров использованных в работе.

Название праймера	Последовательность 5 - 3
F	ATCCGCTATTTACCCAGTGG
R	GCTGTAAACGAACTCGCCAC

Отбор проб проводили согласно «Методическим положениям по выявлению генома вируса в образцах биологического материала и объектах ветеринарного надзора».

Для постановки ПЦР использовали смесь с разным содержанием **dNTPs: 0,5 мкл, 1 мкл, 1,5 мкл и 2 мкл**. На основе полученных результатов можно сделать вывод, о том, что подходящими вариантами ПЦР-смеси по **dNTPs** являются смесь содержащая 1 мкл дезоксинуклеотидтрифосфатов (рис.1).

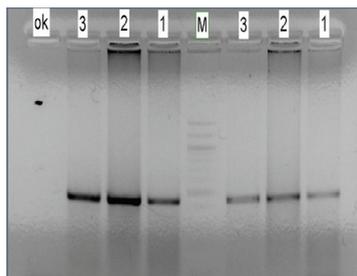


Рисунок 1 - Электрофореграмма результатов выявления генома *P. multocida* методом ПЦР с электрофоретической детекцией при содержании 1 мкл dNTPs в смеси

Треки соответствуют ДНК выделенным из следующего органного материала: **1** - трахея, **2** – селезенка; **3** - легкие; **OK**-отрицательный контроль; **M**- маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bpLadderDNA marker (100bp-3000bp) (Axxygen Biosciences).

Так же для оптимизации реакции нами было опробовано несколько составов ПЦР-смесей с разным содержанием $MgCl_2$: 1 мкл, 1,5 мкл, 2 мкл и 2,5 мкл

Из полученных результатов сделали вывод о том, что оптимальным вариантом ПЦР-смеси является состав, содержащий 1,5 мкл $MgCl_2$ (Рис.3).

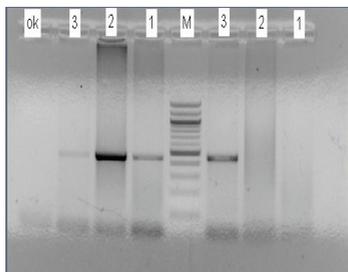


Рисунок 3 – Электрофореграмма результатов выявления генома *P. multocida* методом ПЦР с электрофоретической детекцией при содержании 1,5 мкл $MgCl_2$ в смеси

Треки соответствуют ДНК выделенным из следующего органического материала: **1**-трахея, **2** – селезенка; **3**- легкие;**OK**- отрицательный контроль; **M** - маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bpLadderDNA marker (100bp-3000bp) (Axygen Biosciences).

Следующим этапом нашего исследования была оптимизация температурного режима ПЦР.

С этой целью нами была проведена ПЦР с градиентом температур от 55°C до 60°C, при этом использовали смесь содержащую 1 мкл dNTPs и 1,5 мкл $MgCl_2$.

В результате анализа электрофореграммы результатов выявления генома *P. multocida* методом ПЦР с электрофоретической детекцией при градиенте температур от 55 до 60°C было обнаружено, что праймеры работают в широком диапазоне температур. Как известно, чем выше температура отжига праймеров, тем специфичнее продукт амплификации и поэтому мы рекомендуем использовать температуру 60°C при постановке ПЦР (Рис.4).

Треки соответствуют ДНК выделенным из следующего органического материала: **1**-трахея, **2** – селезенка; **3** - легкие;**OK** - отрицательный контроль; **M**- маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bpLadderDNA marker (100bp-3000bp) (Axygen Biosciences).

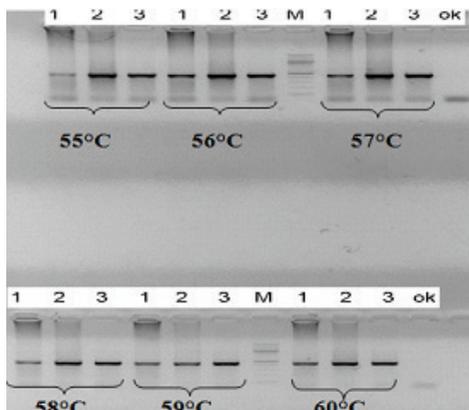


Рисунок 4 - Электрофореграмма результатов выявления генома *R. multocida* методом ПЦР с электрофоретической детекцией при различных температурах (55°C-60°C)

Исходя из полученных результатов, что оптимальным составом смеси для постановки ПЦР является следующий состав:

- 10,5 мкл деионизированной воды;
- 5,0 мкл 5x ПЦР буфера;
- 1,5 мкл 25 мМ MgCl₂;
- по 1,0 мкл прямого и обратного праймера (10 пмоль);
- 1,0 мкл dNTPs (10 пмоль);
- 0,75 ед. (0,15 мкл) Taq-полимеразы;
- 5 мкл матрицы исследуемой ДНК

Оптимальной температурой отжига праймеров является 60°C

Библиографический список

1. Артемов, Б. А. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных./Б. А. Артемов. 2005г. – 152с.
2. Вакцина против миксоматоза кроликов./В.М. Карпов /Кролиководство и звероводство. 1986. - №1. - С. 28
3. Вишняков, И.Ф. Вирусные болезни кроликов/И.Ф. Вишняков., А.А. Шевченко., И.А. Бакулов., Т.А. Власова., -Покров., -1997, С.-84
4. Инфекционная патология животных/ под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина., ТОМ1., М., 2006., -С.

779-780.

5. Инфекционные болезни пушных / Монография., Горки, БГСХА., 2011.,С.-130
6. Кролиководство/ Н. А. Балакирев, Е.А. Тинаева, Н. И. Тинаев, Н.Н. Шумилина; Под.ред. Н. А. Балакирева, -М., КолосС, 2007.С.-232
7. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции от 22.06 1995.
8. ПЦР «в реальном времени»/ Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семенов, А.М. Савилова, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов.-М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009.С- 223.
9. Шевченко, А.А. Вирусные болезни кроликов/А.А.Шевченко Л.В Шевченко. «АКВАРИУМ ЛТД», 2000. - 80 с.

VETERINARY AND SANITARY EXAMINATION OF MEAT OF RABBITS AT PASTEURELLOSIS

Satdarova D.G.

Keywords:PTsR, pasteurellosis, optimization.

In recent years, studying of the problems connected with pasteurellosis of rabbits in the Russian Federation is unreasonably reduced.

As now reliable methods of early diagnosis of pasteurellosis of rabbits are still not developed, the illness continues to remain pernicious in rabbit breeding therefore development of methods of early diagnosis of a disease is an actual scientific problem.

One of tools in diagnosis of infectious diseases is the PTsR method. By means of this reaction there was an opportunity to reveal the activator at any stage of an illness, including latent that allows to reduce time for statement of the diagnosis considerably.