

of young chickens latest technology "Artificial cuticle" (ARTificial cutiCLE - ARTICLE) to protect hatching eggs, which is based on the concept of creating a surface hatching eggs breathable film with biocidal substances. The function of the protective film has a prevention of "secondary" contamination of eggs with the pathogenic microflora. Experimentally proved that the chemical constituents of ARTICLE provide a synergistic stimulatory effect on the metabolism and increase the level of the immune status of young birds.

Key words: hatching eggs "artificial cuticle", metabolism, immunity.

Дата надходження до редакції: 20.04.2014 р.

Рецензент: доктор біол. наук, професор Ю.В.Бондаренко

УДК 577.21: 619:616-07: 664.012.1

ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВРХ У МОЛОЦІ МЕТОДОМ ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

Р. В. Облап, к.б.н., ст.н.с., ДП «Укрметртестстандарт»

Н. Б. Новак, д.б.н., професор, Білоцерківський національний аграрний університет

Т. М. Димань, д.с.-г.н., професор, Білоцерківський національний аграрний університет

Відпрацьовано методику виділення ДНК з цільного молока корів та проведено порівняльні випробування щодо ідентифікації вірусу лейкозу у зразках крові та молока великої рогатої худоби методом ПЛР у реальному часі. Отримані результати свідчать про можливість використання молока як альтернативного діагностичного матеріалу.

Ключові слова: лейкоз ВРХ, ідентифікація вірусу лейкозу, ПЛР у реальному часі, коров'яче молоко.

Постановка проблеми. Харчові продукти та сировина тваринного походження є потенційним джерелом різних патогенів бактеріального та вірусного походження, здатних зашкодити здоров'ю людини. Забруднення харчової продукції може відбуватися на всіх етапах виробництва, починаючи з господарств, де розводять та утримують тварини [1]. З огляду на це, одним із головних завдань державної ветеринарної та фітосанітарної служби є своєчасне виявлення та локалізація джерел інфекції. На жаль, деякі захворювання не мають яскраво виражених клінічних ознак прояву, крім того, спектр та поширеність збудників хвороб постійно змінюється. До однієї з таких хвороб належить і лейкоз великої рогатої худоби (ЛВРХ).

Лейкоз ВРХ є одним із найбільш розповсюджених злоякісних захворювань сільськогосподарських тварин вірусної етіології. Збудником хвороби є РНК-вмісний онкогенний вірус типу С (ВЛ ВРХ, BLV) який належить до родини Retroviridae роду Deltaretrovirus [2]. Життєвий цикл вірусу передбачає обов'язкову стадію інтегрування ДНК-копії (провірусу) вірусного геному в геном інфікованої клітини. ВЛ ВРХ має близьку морфологічну та еволюційну спорідненість з вірусом Т-клітинного лейкозу людини (HTLV-1,2), тому ЛВРХ є однією з найважливіших проблем як ветеринарної медицини і тваринництва, так і інших галузей, які мають безпосереднє відношення до безпеки та здоров'я людини [3].

Щороку тваринництво зазнає значних економічних збитків від ЛВРХ внаслідок загибелі та передчасного вибракування високопродуктивних особин, зниження продуктивності та зменшення строку господарського використання тварин, погіршення якості молока і м'яса та витрат на проти-

лейкозні заходи. Крім того, дотепер залишається відкритим питання безпеки молока, отриманого від інфікованих тварин.

Географія ЛВРХ досить широка, захворювання розповсюджено на всіх континентах та у всіх країнах світу. Україна, де впродовж десятиліть це захворювання залишається серйозною проблемою вітчизняного тваринництва, не є винятком [4].

Важливою умовою для профілактики та боротьби з лейкозом ВРХ є своєчасна достовірна діагностика та ізоляція інфікованих тварин. У вітчизняній практиці лабораторної діагностики ВЛ ВРХ широко застосовують реакцію імунодифузії (РІД) як найбільш доступний та технологічний, хоча і менш чутливий та специфічний метод, ніж імуноферментний аналіз (ІФА). Останнім часом набув популярності метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який дає змогу виявляти мінімальні кількості копій провірусної ДНК у латентному періоді хвороби. Діагностичним матеріалом зазвичай слугують цільна кров або сироватка, в яких містяться специфічні антитіла або сам збудник [5].

На жаль, усі зазначені вище методи діагностики ВЛ ВРХ мають такий спільний недолік, як необхідність відбирання крові у тварин. Зазвичай такі маніпуляції є певним фактором стресу, що негативно впливає на рівень надоїв і може призводити до загального недоотримання молока. Використання цільного молока як діагностичного матеріалу уможливило б значне спрощення процедури безпосереднього контролю за виробництвом якісної та безпечної молочної продукції.

Метою роботи було відпрацювання методики виділення ДНК із цільного молока та проведення порівняльного аналізу щодо виявлення

провірочної ДНК ВЛ ВРХ у зразках крові та молока за допомогою методу ПЛР у реальному часі.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для виділення геномної ДНК слугували зразки крові та молока від інфікованих ВЛ ВРХ тварин. Наявність вірусу у досліджених зразках було попередньо підтверджено методом імуноферментного аналізу (ІФА, ELISA).

Зразки крові відбирали за використання вакуумних систем відбирання крові, що містили антикоагулянт ЕДТА-К2. Екстракцію геномної ДНК здійснювали за допомогою комерційного набору «ДНК-сорб-Б», згідно інструкції виробника (Амплиценс®, Росія). Зразки молока об'ємом 50 мл відбирали в одноразові стерильні контейнери під кінець доїння. Для відпрацювання оптимальної методики виділення ДНК з молока використовували такі загальноприйняті методи, як СТАБ-преципітацію, фенольно-хлороформну екстракцію та сорбцію на силікагелі [6]. Попередньо зразок об'ємом 15 мл центрифугували за температури 4 °С упродовж 30 хв. при 2,000 × g. Отриманий осад відмивали в 1 мл PBS, після чого соматичні клітини осаджували упродовж 10 хв. при 13,000 × g та використовували для екстрагування ДНК. Концентрацію та чистоту виділеної нуклеїнової кислоти визначали методом спектрофотометрії за довжини хвилі $\lambda=260$ нм [7].

ПЛР-ампліфікацію у режимі реального часу проводили за допомогою приладу CFX96 (BioRad, США). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила 2 мкл ДНК, 10 мМ Тріс-НСІ (рН 8,3), 50 мМ КСІ, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ суміші, 10 пкМ кожного з праймерів, 5 пкМ зонду та 1 од. Таq-полімерази (Thermo Fisher Scientific, Литва). Олігонуклеотидні зонди були мічені флуоресцентними барвниками FAM і HEX. Як гасник флуоресценції використовували ВHQ1. Температурний режим складався з початкової денатурації впродовж 3 хв за 94 °С та наступних 45 циклів: денатурації – 20 с за 95 °С, відпалу праймерів – 60 с за 60 °С та синтезу – 30 с за 72 °С. Флуоресцентний сигнал вимірювався на стадії синтезу у кожному циклі ампліфікації. Граничну лінію та базовий рівень флуоресценції прилад розраховував автоматично по завершенню реакції.

Результати досліджень та їх обговорення.

Останнім часом у світовій літературі з'являються публікації щодо використання цільного молока корів для діагностики ВЛ ВРХ. При цьому застосовують як імунологічні, так і молекулярно-генетичні методи аналізу [8, 9]. Молоко як секрет молочних залоз містить у своєму складі достатню кількість соматичних клітин, переважно більшість з яких становлять лейкоцити, морфологічно та функціонально схожі з аналогічними клітинами периферійної крові.

Для своїх досліджень ми обрали метод ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ, Real-Time PCR), який поступово набуває популярності в практиці вітчи-

зняної лабораторної діагностики. На відміну від класичного ПЛР, це кількісний метод, який характеризується високою чутливістю, специфічністю та швидкістю виконання. Під час досліджень зразків ДНК з крові та молока на присутність ВЛ ВРХ використовували технологію *TaqMan* методу ПЛР-РЧ [10]. Застосована нами система є мультиплексною, оскільки уможливує проведення двох незалежних реакцій в одній пробірці. Одна реакція направлена на виявлення ділянки гена *Env*, що кодує поверхневий вірусний глікопротеїд *gp51* та уможливує детектування ВЛ ВРХ, інша – на виявлення фрагмента гена пріонового білка ВРХ (PRNP) як ендогенного контролю перебігу ПЛР [11]. Перебіг кожної з реакцій відстежували за допомогою мічених зондів. Для виявлення послідовності *gp51* використовували зонд, мічений флуоресцентним барвником FAM та гасником флуоресценції ВHQ1, для гена PRNP – мічений барвником HEX та гасником флуоресценції ВHQ1.

Пробу розглядали як позитивну на присутність ВЛ ВРХ лише в тому випадку, коли сигнал флуоресценції детектувався за двома каналами (FAM і HEX), а значення *С_t* варіювало з 15 по 40 цикл залежно від кількості матеріалу, взятого для виділення ДНК. Відповідно, пробу розглядали як негативну, якщо сигнал детектувався лише за каналом HEX (ендогенний контроль), що свідчило про коректне проведення усіх стадій аналізу та відсутність інгібіторів ферментативної реакції в пробі. Якщо флуоресценція була відсутньою за двома каналами (FAM і HEX), проводили повторне дослідження цієї проби зі збільшенням кількості вихідного матеріалу, взятого для виділення ДНК.

Загалом було досліджено зразки крові та молока від 10 тварин. Дев'ять особин були інфіковані ВЛ ВРХ, а присутність вірусу попередньо підтверджена методом ІФА. Всі три випробувані підходи екстракції ДНК з молока дали позитивний результат. Найбільшої кількості ДНК за її задовільної якості вдалось отримати у разі використання методу сорбції на силікагелі. Концентрація виділеної ДНК знаходилась у межах 40–80 нг/мкл зі ступенем очищення 1,8–2 за співвідношення оптичних густин λ 260/280. Варто зазначити, що цієї кількості ДНК цілком достатньо для проведення аналізу, хоча вихід ДНК із зразків крові був значно більший (250–500 нг/мкл) за збереження тієї самої чистоти препарату ДНК.

Проведений ПЛР-РЧ-аналіз ДНК, виділеної зі зразків крові, повністю підтвердив результати імунологічного дослідження. Усі дев'ять ІФА-позитивних зразків показали наявність провірочної ДНК ВЛ ВРХ, десятий зразок виявився негативним за двома методами аналізу. Значення граничного циклу *С_t* за каналом FAM були в межах від 26 до 34, за каналом HEX – від 23 до 25.

Для порівняльної оцінки використання аль-

тернативного діагностичного матеріалу паралельно було проведено ПЛР-РЧ аналіз ДНК, виділеної зі зразків молока від тих самих особин. Отримані результати підтвердили можливість використання молока для діагностики ВЛ ВРХ, але з певними обмеженнями. Зразки від ІФА-позитивних тварин дали позитивний ПЛР-сигнал, ІФА-негативний зразок дав негативний сигнал. Значення граничного циклу C_T за каналом FAM були в межах від 36 до 42, за каналом HEX – від 25 до 27. Таким чином, різниця значень C_T між зразками крові та молока за каналом FAM становила порядку 10 циклів. Такі розбіжності в значеннях є цілком закономірними з огляду на кількісне співвідношення соматичних клітин у крові та молоці. На жаль, за такої великої розбіжності значень C_T можна отримати хибно-негативний

сигнал у зразку молока у випадку низької концентрації вірусу. На нашу думку, вирішення цієї проблеми було б збагачення досліджуваного зразку соматичними клітинами, наприклад, за рахунок збільшення об'єму.

Висновки. Виконано порівняльну оцінку ефективності використання молока як альтернативного діагностичного матеріалу для ідентифікації вірусу лейкозу у великої рогатої худоби. Показано можливість використання молока під час діагностики ВЛ ВРХ методом ПЛР у реальному часі. Отримані результати потребують подальшого вивчення для підвищення ефективності ампліфікації ДНК, виділеної зі зразків молока з метою запобігання отриманню хибно-негативних результатів.

Список використаної літератури:

1. Димань Т.М. Безпека продовольчої сировини і харчових продуктів / Т.М. Димань, Т.Г. Мазур. – К.: ВЦ «Академія». – 2011. – 520 с.
2. Burny A. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leucosis / A. Burny, C. Bruck, Y. Cleuter et al. // Onderstepoort J. Vet. Res. – 1985. – №52. – P. 133-144.
3. Мальцева Н.А. Лейкоз крупного рогатого скота – пути решения проблемы / Н.А. Мальцева, В.И. Баранов, Е.И. Олийник и др. // Электронный журнал «Исследовано в России», <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2000/102.pdf>
4. Аранчій С.В. Епізоотологічний моніторинг лейкозу ВРХ в Україні, починаючи з 2000 року по осінь 2012 року / С.В. Аранчій, Д.О. Рудяшко // Вісник Полтавської державної аграрної академії. – 2013. – № 1. – С.94-96.
5. Абрамов А.В. Порівняльна ефективність діагностики лейкозу ВРХ при використанні різних методів дослідження / А. В. Абрамов, Д. М. Король, С. Д. Мельничук // Ветеринарна медицина України. – 2007. – № 2. – С. 33-34.
6. Nishiguchi M.K. DNA Isolation Procedures / M.K. Nishiguchi, P. Doukakakis, M. Egan et al. // <http://labs.medmicro.wisc.edu/mcfall-ngai/papers/2002nish3.pdf>
7. Облап Р.В. Методичні рекомендації щодо використання методу полімеразної ланцюгової реакції в скотарстві / Р.В. Облап, Н.Б. Новак, М.Д. Мельничук, Т.М. Димань, О.В. Дубін; за ред. Т.М. Димань. – Біла Церква: Видавництво БНАУ. – 2010. – 68 с.
8. Kuckleburg C.J. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions / C.J. Kuckleburg, C.C. Chase, E.A. Nelson // J. Vet. Diagn. Invest. – 2003. – №15. – P. 72-76.
9. Боровиков С.Н. Использование моноклональных антител в ИФА для обнаружения специфических антител против вируса лейкоза крупного рогатого скота в молоке / С.Н. Боровиков, В.С. Киян, А.О. Агмашев // Вестник науки КазАТУ им. С.Сейфуллина. – 2011. – №2 (69). – С. 45-49.
10. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов и др. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2009. – 223 с.
11. Новак Н.Б. Діагностика провірусної ДНК вірусу лейкозу Великої Рогатої Худоби / Н.Б. Новак, Р.В. Облап, М.Д. Мельничук // Вісник аграрної науки. – 2008. – № 11. – С.22-24.

Облап Р.В., Новак Н.Б., Димань Т.Н. ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРС В МОЛОКЕ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Отработана методика выделения ДНК из цельного коровьего молока и проведены сравнительные испытания диагностики ВЛ КРС в образцах крови и молока методом ПЦР в реальном времени. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования молока в качестве альтернативного диагностического материала.

Ключевые слова: лейкоз КРС, идентификация вируса лейкоза, ПЦР в реальном времени, коровье молоко.

Oblap R., Novak N., Dyman T. BOVINE LEUKOSIS VIRUS DETECTION IN MILK BY REAL-TIME PCR

Bovine leukosis virus (BLV) is one of the most wide-spread cancer diseases of agricultural animals. It brings many economic negatives because of animal death, low income of animal products and loss of unique gene pool of high-productive animals. Disease agent is leukosis virus, which belongs to Retroviridae, Deltaretrovirus. It is RNA-contained cancer virus of type C, its vital cycle consists of necessary stage of integration of DNA-copy (provirus) of virus genome into genome of infected animal. Bovine Leukosis is a serious problem for national cattle breeding in Ukraine for many years. Solution of this problem is possible with timely reliable diagnostics and isolation of infected animals.

Nowadays immunological and molecular-genetic approaches are applying in laboratory diagnostic of BLV. Different biological liquids, especially whole blood and serum are used as diagnostic material. At the same time blood sampling is one of significant difficulties of modern analysis methods because of its stressogenic for cows. There is an information in scientific literature about possibility of milk using as alternative source of diagnostic material.

We have designed the methodology of bovine whole blood DNA extraction and performed comparative tests for BLV diagnostics in blood and milk samples in this study. Provirus BLV DNA identification was provided by Real-Time PCR. We analyzed totally 10 milk and blood samples from the same animals. BLV infection of animals was previously confirmed by ELISA.

Performed analysis confirmed possibility of milk using for Real-Time PCR BLV analysis. But it has some limitations. In condition of relatively low concentration of virus in sample there is a possibility of false-negative results. Data obtained has to be further studied for high-effectiveness of amplification of milk-extracted DNA.

Key words: enzootic bovine leukosis, detection of BLV, Real-Time PCR, cow's milk .

Дата надходження до редакції: 16.07.2014 р.

Рецензент: доктор с.-г. наук, професор Л.М.Хмельничий

УДК 636.59.087:637.04

ХІМІЧНИЙ СКЛАД М'ЯСА ПЕРЕПЕЛІВ, ВИРОЩЕНИХ ЗА ВИКОРИСТАННЯ НАНОСРІБЛА

Л. С. Патрєва, д.с.-г.н., професор

В. І. Гроза, асистент

Миколаївський національний аграрний університет

Представлено результати хімічного складу грудних м'язів перепелів у віці 49 днів, вирощених з використанням срібловмісного препарату «Аргенвіт». Встановлено, що 0,01 і 0,02% розчини наносрібла позитивно впливають на якість м'яса перепелів.

Ключові слова: перепели, препарат «Аргенвіт», хімічний склад м'яса.

Постановка проблеми. За прогнозами, у 2022 році м'ясо птиці у загальному м'ясному балансі світу становитиме перше місце, друге – свинина, третє – яловичина. Одночасно за аналізом сучасних експертів дефіцит м'яса у світі на той час ставитиме близько 400 млн. тонн. Сучасний стан характеризується тим, що багато країн імпортують м'ясо птиці, що свідчить про зростання попиту на нього та, відповідно, зумовлює інтенсивний розвиток птахівництва. Причому видова та асортиментна різноманітність є одним із основних вимог сучасних споживачів [7].

Птахівництво в більшості країн світу займає провідну позицію серед інших галузей сільського господарства. У зв'язку з необхідністю забезпечувати населення країни білками тваринного походження, а також продуктами харчування дієтичного та функціонального призначення, перепелівництво стає перспективним напрямком галузі птахівництва [9].

Перепели мають ряд вагомих продуктивно-господарських переваг перед іншими видами птиці. Так, у перепелів вища швидкість росту у 5 разів, ніж у курей, у них більш рання яйцекладка, при цьому вони не вибагливі до умов утримання. На однаковій площі перепелів можна тримати в 10 разів більше, ніж курей і, вважається, що ця галузь є однією з найбільш рентабельних у птахівництві [3].

Разом з невисокою калорійністю перепели-

ного м'яса, дуже багате білком філе, майже 22%. В хімічний склад м'яса перепелів входить достатньо велика кількість вітамінів та мінералів. Перепелине м'ясо містить дуже мало холестерину [8].

Цей дієтичний продукт має антибактеріальну, імуномодельючу, протипухлинну властивості, нормалізує діяльність шлунково-кишкового тракту, серцево-судинної та інших систем. Перепелині яйця – це концентрований біологічний набір необхідних людині речовин [6].

В умовах підвищеного попиту на екологічно чисті продукти птахівництва виникла необхідність заборони антибіотиків, гормональних та інших стимуляторів продуктивності птиці. У зв'язку з цим, активізувався пошук нових альтернативних підходів до підвищення продуктивності птиці [2].

Відомо, що використання антибіотиків у годівлі сільськогосподарських тварин і птиці призводить до знешкодження не лише шкідливої мікрофлори, але і корисної, крім того, вони мають здатність до накопичення у продуктах тваринництва і птахівництва, що стало причиною заборони антибіотиків до використання у країнах Європи.

Тому, з метою стимуляції продуктивності тварин і птиці науковці та практики ведуть пошук альтернативних біологічно активних кормових добавок природного походження, які повинні бути більш безпечними і такими, що не накопичуються в м'язовій тканині [11].

Застосування у птахівництві України препа-