

Оценка противовирусной активности бактерий, входящих в состав препарата Проваген, на модели вируса болезни Марека 3-го серотипа

В. Н. Афонюшкин, кандидат биологических наук, заведующий сектором молекулярной биологии, Сибирский федеральный центр агrobiотехнологий Российской академии наук, Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

А. Н. Ширишова, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, ООО «Ветбиотест», Новосибирск

Д. В. Шамовская, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, ООО «Ветбиотест», Новосибирск

Д. А. Плоmodityлов, кандидат ветеринарных наук, ООО «ТрионисВет», Минск

В своей клинической практике мы регулярно сталкивались с ситуациями, когда введение пациенту антибиотика широкого спектра действия сопровождалось диарейным синдромом.

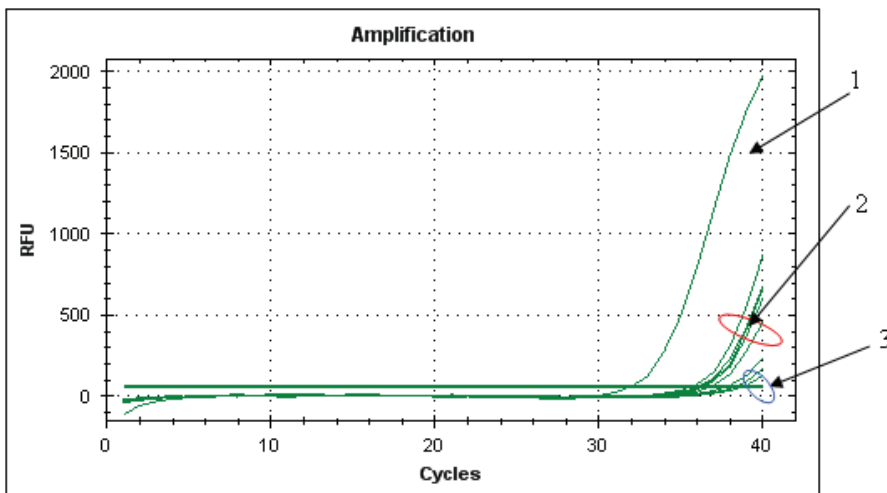
Рассматривая это явление как постантибиотический дисбиоз, мы тем не менее нередко обнаруживали обострение различных вирусных инфекций, как в кишечнике, так и в респираторной системе. Если обострение респираторных вирусных инфекций при постантибиотическом дисбиозе легко объяснялось повышением реактивности организма в ответ на изменение состава кишечной ми-

кробиоты, то накопление вирусов (реовирусов, флавивирусов и т.д.) в кишечнике заставило нас выработать гипотезу о взаимодействии вирусов и бактерий.

В просвете кишечника вирусные частицы (вирусы эукариот) являются для бактериальных клеток всего лишь скоплением белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и, в ряде случаев, липидов. Поэтому вирусы должны достаточно

активно разрушаться бактериями и в кишечнике (по-видимому, между воспроизводством вирусных частиц в слизистой кишечника и их разрушением бактериальной микробиотой наблюдается динамическое равновесие). Следовательно, снижение концентрации бактерий должно приводить к накоплению вирусных частиц в просвете кишечника, к росту числа инфицированных клеток кишечника





ПЦР в режиме реального времени на наличие вируса герпеса индеек FC126:
1 – контроль (исходный образец вакцины); 2 – отрицательный контроль (разведенная вакцина без Провагена); 3 – вакцина + Проваген в концентрации 8 log₁₀ КОЕ/мл. Чем раньше появляется сигнал (обозначен овалами) тем больше вируса было в образце

Результаты ПЦР в режиме реального времени на наличие геномной ДНК FC 126 (вируса герпеса индеек)

| № п/п | Без Провагена | С Провагеном | Ct1-Ct2 |
|------------------------|---------------|--------------|-------------|
| 1 | 35,49 | 36,23 | -0,74 |
| 2 | 36,04 | 37,6 | -1,56 |
| 3 | 35,94 | 38,6 | -2,66 |
| 4 | 36,65 | 38,21 | -1,56 |
| Среднее арифметическое | 36,03 ±0,23 | 37,66 ±0,51* | -1,63 ±0,39 |

$p = 0,014546$.

и к развитию диареи или вирусной мальабсорбции. Для проверки гипотезы о разрушении вирусов бактериями мы изучили повреждающее действие бактерий рода *Bacillus* входящих в состав препарата Проваген в отношении вируса болезни Марекка 3-го серотипа (вируса герпеса индеек).

Материалы и методы

Исследования проводили на базе лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и сектора молекулярной биологии СФНЦА РАН.

В 450 мл фосфатно-солевого буфера (содержащего вакцинный штамм FC 126) вносили разведенный Проваген в объеме 50 мкл и титровали с шагом 1:10, получив концентрации $3,5 \times 10^8$ – $3,5 \times 10^5$

КОЕ/мл. Инкубировали при 37 °С в течение 4 часов после чего выделяли ДНК силикосорбционным методом. Также проводили контрольные постановки без Провагена и без вируса. Все опыты выполняли в четырех повторностях. Концентрацию бактерий определяли методом последовательных разведений на Eugonic- агаре.

Наличие геномной ДНК вируса герпеса индеек выявляли с помощью ПЦР в режиме реального времени. ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл, содержащем 67 мМ трис-НСl (рН 8,9); 16 мМ сульфата аммония; 2,4 мМ MgCl₂; 0,01 % Твин 20; 0,2 мМ дНТФ; 0,5 мкМ раствора олигонуклеотидных праймеров и 1ED Taq-полимеразы. ПЦР в режиме реального времени с SYBRGreen проводили на амплификаторе CFX (BiRad) с начальной денатурацией при 95 °С 3 мин., да-

лее в течение 45 циклов с денатурацией при 95 °С 10 сек., отжигом при температуре 62 °С в течение 10 сек. и синтезом при 72 °С в течение 10 сек. Финальная элонгация проводилась 3 мин при 72 °С.

Результаты исследования

Как следует из полученных данных (см. таблицу и диаграмму), в течение четырех часов инкубации активности бактерий в составе препарата Проваген недостаточно для полной инактивации вирусных частиц (вируса герпеса индеек, штамм FC 126). Однако статистически достоверно ($p < 0,05$) повышается пороговый цикл (Ct) в ПЦР, специфичной в отношении вируса герпеса индеек. Это свидетельствует о снижении концентрации вирусной ДНК в культуральной жидкости.

Следует учитывать, что для разрушения вирусной ДНК необходимо последовательное разрушение вирусной оболочки, слоя капсомеров (последовательно липазой и протеазой), и только после этого, в течение довольно продолжительного времени, будет происходить разрушение собственно вирусной ДНК. То есть вирусные частицы с разрушенной ДНК были инактивированы бактериями задолго до расщепления нуклеиновой кислоты.

На данном этапе мы можем утверждать, что в составе препарата Проваген есть микроорганизмы, способные разрушать герпес-вирусы. Для полной инактивации вирусов и их генетического материала, требуется или более длительная экспозиция, или более высокая концентрация бактерий, или более высокая активность ферментных систем.

Заключение

Бактерии, входящие в состав препарата Проваген, способны статистически достоверно снижать концентрацию вируса болезни Марекка, что дает основание рекомендовать его распыление в птичниках по завершении дезинфекции.