



**ПЪРВИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ТРИ ЗАСТРАШЕНИ ОТ ИЗЧЕЗВАНЕ ПОРОДИ ОВЦЕ ОТ ЗАПАДНА БЪЛГАРИЯ  
PRELIMINARY RESEARCH OF THREE ENDANGERED SHEEP BREEDS IN WESTERN BULGARIA**

**Александър Куков<sup>1\*</sup>, Иво Сираков<sup>2</sup>, Михаил Червенков<sup>1</sup>, Ралица Попова<sup>2</sup>, Стефан Алексиев<sup>2</sup>,  
Деница Даскалова<sup>1</sup>, Ирина Кирилова<sup>1</sup>, Андрея Колев<sup>3</sup>  
Alexander Kukov<sup>1\*</sup>, Ivo Sirakov<sup>2</sup>, Mihail Chervenkov<sup>1</sup>, Ralitsa Popova<sup>2</sup>, Stefan Aleksiev<sup>2</sup>,  
Denica Daskalova<sup>1</sup>, Irina Kirilova<sup>1</sup>, Andreya Kolev<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Институт по биология и имунология на размножаването “Акад. К. Братанов”

Българска академия на науките – София

<sup>2</sup>Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт

“Проф. Г. Павлов” – София

<sup>3</sup>Институт по екобиотехнологии ООД – София

<sup>1</sup>Institute of Biology and Immunology of Reproduction “Acad. K. Bratanov”

Bulgarian Academic of Sciences – Sofia

<sup>2</sup>National Diagnostic and Research Veterinary Institute “Prof. G. Pavlov” – Sofia

<sup>3</sup>Institute of Ecobiotechnologies Ltd. – Sofia

\*Email: a\_dimitroff@abv.bg

### Резюме

Голям брой местни породи овце в България, формирани в продължение на много години народна селекция, са застрашени от изчезване. Особено тежка е ситуацията при Брезнишката (Бр), Западностаропланинската (ЗСП) и Софийската (Елин-Пелинската) (СфЕП) порода овце. За да се подпомогне запазването на тези автохтонни породи, е важно да се получат повече данни за устойчивостта им към скрейпи. От друга страна, е важно да се установи дали има наличие на патогенни щамове на *Escherichia coli* в мляко, получено от тези овце. Събрани са кръвни проби от трите породи и е получена ДНК за определяне на устойчивостта към скрейпи. Изследвани са млечни проби от овце за наличие на патогенни *Escherichia coli* (*E. coli*). След провеждане на PCR на участък от *PrP* гена получихме продукти с големина 903 bp. Това показва консервативност на *PrP* гена при тези автохтонни български породи овце, с което се потвърждава принадлежността на изследваните породи към общия генотип в участъка 687-710 база и 1590–1567 база на *PrP* гена. В млечните проби беше установен незначителен растеж на *E. coli*, но не и на патогенни щамове.

### Abstract

A large number of local sheep breeds in Bulgaria, formed over many years of folk selection are endangered. The situation is especially severe in Breznik, West Stara Planina and Sofia (Elin-Pelin) sheep breeds. In order to assist the preservation of these indigenous breeds, it is essential to obtain more data on their resistance to scrapie. On the other hand it is important to establish whether there is a presence of pathogenic strains of *Escherichia coli* in the milk obtained from these sheep. Blood samples were collected from all three breeds and DNA was obtained for determination of the resistance to scrapie. Milk samples from sheeps were examined for the presence of pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*). Products with size of 903 bp were obtained after conducting PCR. This indicates conservatism of the *PrP* gene in these indigenous Bulgarian sheep breeds, confirming that these breeds belongs to the attachment of the target species to the common genotype in the region 687-710 base and 1590-1567 based on the *PrP* gene. In milk samples was found negligible growth of *E. coli*, but not of pathogenic strains.

**Ключови думи:** застрашени от изчезване породи овце, скрейпи, разпространение, *Escherichia coli*.

**Key words:** endangered sheep breeds, scrapie, spreading, *Escherichia coli*.

### ВЪВЕДЕНИЕ

Голям брой местни породи овце в България, формирани в продължение на много години народна селекция, са застрашени от изчезване. Особено тежка

е ситуацията при Брезнишката (Бр), Западностаропланинската (ЗСП) и Софийската (Елин-Пелинската) (СфЕП) порода овце. По данни на Развъдната асоциация на аборигенни породи овце от Западна

България (РААПОЗБ) в момента броят животни от ЗСП и Бр порода е под 1000, което прави популациите им застрашени от изчезване. При СфЕП порода популацията е по-голяма, но селекционна дейност се развива с около 1400 животни (по данни от РААПОЗБ). По литературни данни (Porodi selskостopanski zivotni, 2011) ареалът на разпространение на трите породи е, както следва: за Брезнишката порода – в районите на селища, намиращи се в Западна България – предимно в общините Брезник, Трън и Радомир; за Западностаропланинската порода – в селища в областите София, Монтана и Враца и най-вече в общините Берковица, Вършец и Ботевград; за Софийската (Елин-Пелинската) порода – в селищата на община Елин Пелин, Нови хан, Равно поле, Иваняне и Враждебна (Породи селскостопански животни в България, 2011).

Скрейпи е заболяване на централната нервна система при овцете с летален изход, предизвикано от протеазорезистентен протеин PrP (Prusiner, 1990; Hunter, 1991). Заболяването е под контрола на Европейския съюз чрез Регламент 999/2001ЕС(2001). Съгласно с регламента някои от мерките, свързани с борбата срещу заболяването, може да окажат сериозно влияние върху оцеляването на отделни породи овце. Тъй като млякото от овце се използва за направата на млечни продукти за човешка консумация (кашкавал, кисело мляко, сирене и др.), е изключително важно то да бъде свободно от патогенни микроорганизми.

Целта на това изследване е размножаване на участък от Prp гена и анализ на резултатите и определяне наличието на патогенни E.coli в млякото на три застрашени от изчезване, автохтонни породи овце – Брезнишката, Западностаропланинската, Софийската (Елин-Пелинската), отглеждани в България.

#### МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследването се проведе в периода май–ноември 2012 г. във ферми, разположени в общините Сливница, Брезник, Трън, Ботевград и Елин Пелин. Бяха посетени както малки, така и по-големи ферми с брой на животните между 60 и 330.

От трите породи получихме кръвни проби в стерилни вакуумтейнери с антикоагулант ЕДТА (Wenzhou Gaode Medical Instruments, China). Пробите транспорти-

рахме на 4°C и съхранявахме при -20°C. Броят и видът на взетите проби са отразени в табл. 1. От събраните кръвни проби получихме ДНК чрез използване на Blood genomic extraction kit (Geneshun Biotech, China) съгласно с инструкциите на фирмата производител.

След получаване на ДНК проведохме PCR за размножаване на PrP гена по процедура, описана от Sirakov et al. (2011). Като референтна секвенция използвахме AY326330.5 (Heaton, 2003).

За изолиране на патогенни Escherichia coli изследвахме 13 броя млечни проби. Бяха използвани следните селективни среди - Сорбитол МакКонкиагар-SMAC (Merck, Germany), TBX (Триптон жлъчка глукоронид), както и МакКонки агар (Himedia, India).

Проведен беше и конвенционален PCR за детекция на патогенни E.coli. ДНК от E. coli изолирахме от 20-часова бульонна култура с кит за изолиране на ДНК Instagene DNA Purifica Matrix (Biorad, France), съгласно с инструкциите на фирмата производител. За извършването на конвенционалния PCR на ДНК, получена от E. coli, използвахме специфични праймери за участък от stx1, stx2, eae гените, описани от Paton (1998).

Количеството и качеството на получените ДНК от кръвните и млечните проби контролирахме чрез провеждане на гел електрофореза с 2% агароза и 0,05% визуализиращо вещество за ДНК GoldView (Gene shun Biotech, China) и спектрофотометрично с апарат GeneQuant II (GE Healthcare).

#### РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

При проучване на Брезнишката порода бяха посетени ферми и стопанства в селата Гълъбовци (община Сливница), Филиповци (община Трън), Непразненци и Конска (община Брезник). От посетените стопанства, отглеждащи Западностаропланинска порода овце, най-голямото е в село Рашково (Ботевград) с 270 животни.

Стопанства в района на Елин Пелин бяха посетени за провеждане на изследвания върху Софийската (Елин-Пелинската) порода овце (таблица 2).

Поради търговията с овце (от други породи) с неизяснен здравен статус и произход в стопанства, където се отглеждат изследваните от нас породи овце, съществува сериозен риск от внасяне на заболявания,

**Таблица 1.** Категория на животните по възраст и брой животни, от които са взети кръвни проби  
**Table1.** Categorization of the animals by age and number of animals from which blood samples were taken

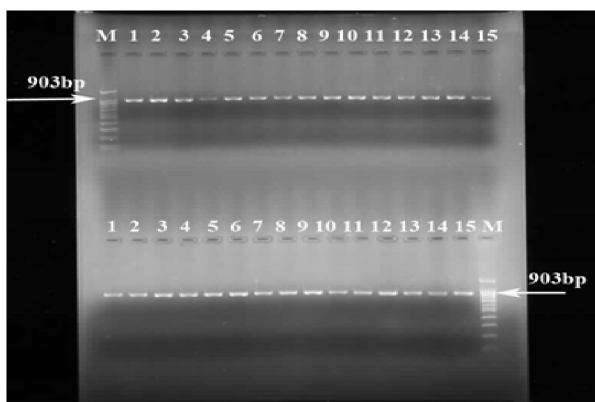
Категория животни Group of animals	Порода овце / Sheep breeds		
	Брезнишка Breznishka	Софийска Sofia	Западностаропланинска West Staroplaninska
Коч / Ram	8	6	5
Овца / Ewe	21	14	23
Млади* / Younger*	6	12	1
Общо / Total	35	32	29

\*Млади – агнета, шилета и дзвиски / Younger – under 1 year of age



**Таблица 2.** Брой животни от трите изследвани породи овце в посетените стопанства към ноември 2012  
**Table 2.** Number of animals of all three sheep breeds in the visited farms, as of November 2012

Община / Municipality	Населено място / Village	Брой животни Number of animals	Порода / Breed
Сливница / Slivnitsa	Гълъбовци / Galabovtsi	102	Брезнишка Breznishka
	Гургулят / Gurgulyat	61	
Брезник / Breznik	Конска /Konska	46	
	Непразненци / Nepraznentsi	87	
Трън / Tran	Филиповци / Filipovtsi	42	
Перник / Pernik	Мешица / Meshtica	74	
Ботевград / Botevgrad	Рашково / Rashkovo	270	Западностаропланинска West Staroplaninska
Сливница / Slivnitsa	Сливница / Slivnitsa	49	
	Алдомировци / Aldomirovtsi	83	
Елин Пелин	Нови Хан / Novi Han	330	Софийска (ЕлинПелинска) Sofia (Elin Pelin)
Elin Pelin	Елин Пелин / Elin Pelin	100	
Ботевград / Botevgrad	Литаково / Litakovo	224	



**Фиг. 1.** PCR продукти с големина 903 bp от намножаване на *PrP* гена на овце от Западностаропланинската порода

**Fig.1.** PCR products with length of 903bp after amplifying *PrP* gene of West Staroplaninska sheep breed

включително и скрейпи. Именно затова една от целите на настоящото проучване е да се установи устойчивостта на Бр., ЗСП и СфЕП овце към скрейпи.

От взетите проби са изолирани чисти геномни ДНК образци, подходящи за провеждане на PCR анализи и намножаване на прионовия ген. След провеждане на PCR получихме продукти с големина 903 bp. Намножаването на този участък е вследствие на специфичното захващане на праймерите към комплементарните участъци от веригата на ДНК. Това показва консервативност на *PrP* гена при тези автохтонни български породи овце, с което се потвърждава принадлежността на изследваните породи към общия генотип в участъка 687-710 база и 1590-1567 база на *PrP* гена (съгласно с референтна секвенция AY326330.5); (фиг. 1). Първоначалният анализ на данните показва, че изследваните автохтонни породи овце попадат в група, при която на позиция 690 от *PrP* гена има тимидин, за разлика от другата група,

при която на същата позиция има аденин - AY326330.5 (Heaton et al., 2003).

При използване на селективни хранителни среди в 8 млечни проби беше установен растеж на *E. coli*, а 5 бяха отрицателни. *E. coli* расте като синьо-зелени колонии върху селективна хранителна среда TBX и като розово-червени колонии върху МакКонки агар. Осем от изследваните проби сурово мляко показаха характерен растеж за *E. coli* върху използваните селективни хранителни среди (таблица 4). Провеждането на реакцията с индол показва положителна реакция в две от осемте проби, а останалите 6 проби бяха отрицателни. Този резултат показва, че изолираните бактерии при тези 6 проби са други представители на сем. *Enterobacteriaceae*. След проведен PCR на потвърдените две проби не доказахме гени на вирулентност *stx1*, *stx2* и *eae*.

## ИЗВОДИ

1. След извършване на изолация на селективни среди в млечните проби от трите породи беше установен незначителен растеж на *E. coli*, но не и на патогенни щамове. Резултатът беше потвърден и от проведения конвенционален PCR. Тъй като преживните животни често са носители на патогенни *E. coli* в храносмилателния тракт, отсъствието им при изследване на млякото показва, че то не представлява опасност за човешка консумация по отношение на тях, но и че трябва да се спазват хигиенните изисквания по време на доенето.
2. След провеждане на PCR получихме продукти с големина 903 bp. Това показва консервативност на *PrP* гена при тези автохтонни български породи овце, с което се потвърждава принадлежността на изследваните породи към общия генотип в участъка 687-710 база и 1590-1567 база на *PrP* гена. Мерките, предвидени от Европейския съюз в борбата със скрейпи, липсата на развъдни програми в България

**Таблица 3.** Растеж на *E. coli* от млечните проби върху селективни хранителни среди  
**Table 3.** Growth of *E. coli* from the milk samples, on selective medium

Номер на проба Sample number	Растеж върху селективна хранителна среда Growth on selective medium		Породи
	TBX TBX	МакКонки агар MacConkey agar	
1	Синьо-зелени колонии Blue-green colonies	Нехарактерен растеж Non-typical growth	Брезнишка Breznishka
2	Бели колонии White colonies	Бели колонии White colonies	
3	Бели колонии White colonies	Стерилен Sterile	
4	Бели колонии White colonies	Розови колонии Pink colonies	
5	Бели колонии White colonies	Стерилен Sterile	
6	Бели колонии White colonies	Розови колонии Pink colonies	
7	Синьо-зелени колонии Blue-green colonies	Розови колонии Pink colonies	
8	Бели колонии White colonies	Розови колонии Pink colonies	Софийска (ЕлинПелинска) Sofia
9	Синьо-зелени колонии Blue-green colonies	Розови колонии Pink colonies	
10	Синьо-зелени колонии Blue-green colonies	Розови колонии Pink colonies	
11	Бели колонии White colonies	Нехарактерен растеж Non-typical growth	Западно-старопланинска West Staroplaninska
12	Синьо-зелени колонии Blue-green colonies	Розови колонии Pink colonies	
13	Синьо-зелени колонии Blue-green colonies	Розови колонии Pink colonies	

по отношение на устойчивостта към заболяването и малкият брой животни в популацията на тези три породи правят наложително провеждането на генотипизиране, изготвяне на стратегия за селектиране на устойчиви към скрейпи стада, което ще доведе до съхранение на уникалния им генофонд и увеличаване на тяхната популация, с което ще се увеличи и задоволеността на населението от висококачествени месни и млечни биопродукти.

#### LITERATURA

- Porodi selskostopanski zivotni v Bulgaria, 2011. (pod obsht. red na dots. d-r V. Nikolov), Katalog, 3-to izdanie, IASRZh, Sofia, str. 40; 44-45; 46-47.
- Reglament (EO) № 999/2001 na Evropeyskia parlament i na Saveta ot 22 may 2001 g. otnosno opredelyane na pravila za preventsia, kontrol i likvidirane na nyakoi transmisivni spongiformni entsefalopatii. [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse\\_bse/monitoring\\_annual\\_reports\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse_bse/monitoring_annual_reports_en.htm)
- Heaton, MP, K. A. Leymaster, B., A. Freking, D. A. Hawk, T. P. Smith, J. W. Keele, W. M. Snelling, J. M. Fox, C. G. Chitko-McKown, W. W. Laegreid, 2003. Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer. *Mamm. Genome*, 14 (11), 765-777.
- Hunter, N., 1991. Scrapie and GSS - the importance of protein, *TINS*, Vol. 14, №9, 389-390.

- Patton, A. W., J. C. Patton, P. A. Manning, 1993. Polymerase chain reaction amplification, cloning and sequencing of variant *Escherichia coli* of Shiga-like toxin type II operon, *Microb. Pathog.*, 1993, 15: 77-82.
- Prusiner, S.B., M. Scott, D. Foster, K. Pan, D. Groth, C. Miranda, M. Torchia, S. Yang, D. Serban, G. Carlson, P. Hoppe, D. Westaway, S. DeArmond, 1990. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication, *Cell*, 63, 673-686.
- Sirakov, I., R. Peshev, L. Christova, 2011. Genetic predisposition of some Bulgarian sheep breeds to the scrapie disease *Virus Genes*, 43:153-159, DOI 10.1007/s11262-011-0615-7.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Тези проучвания бяха извършени благодарение на проектите „Комплексен анализ на редки български породи овце – опазване и устойчиво развитие“ по договор ДМУ 03/28 и „Генотипизиране за скрейпи резистентност на уязвими, застрашени от изчезване породи овце в България и търсене на допълнителен полиморфизъм в *PrP* гена“ по договор ДМУ 03/114, финансирани от фонд „Научни изследвания“ по проект „Млад учен 2011“, както и на членовете на Развдната асоциация на аборигенни породи овце от Западна България.

Статията е приета на 12.12.2012 г.  
 Рецензент – проф. дсн Десимир Неделчев