

На правах рукописи

Осяпова Елена Петровна

**Применение полимеразной цепной реакции для идентификации
микобактерий и ее диагностическая значимость при туберкулезе крупного
рогатого скота.**

16.00.03. – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология.

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2004

Работа выполнена в ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р.Коваленко (ВИЭВ) и в Институте молекулярной генетики РАН.

Научные руководители: доктор ветеринарных наук А.Х.Найманов
кандидат медицинских наук В.В.Демкин

Официальные оппоненты: доктор биологических наук О.А.Верховский
(НПО «Нарвак»)
доктор биологических наук Л.Н.Черноусова
(ЦНИИТ)

Ведущая организация: Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина

Защита диссертации состоится «30» июня 2004 г. в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.01 в ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко по адресу: 109428, Москва, Рязанский проспект, 24/1, ВИЭВ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВИЭВ.

Автореферат разослан «28» мая 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
профессор



Н.П.Овдиенко

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

1.1. Актуальность темы. Среди инфекционных болезней животных особенного внимания заслуживает туберкулез крупного рогатого скота, наносящий большой экономический ущерб животноводству и представляющий серьезную опасность для здоровья людей в настоящее время.

Учитывая сложившуюся ситуацию по туберкулезу людей в мире, Всемирная организация здравоохранения и Международный союз борьбы с туберкулезом объявили туберкулез «Проблемой всемирной опасности» и «Экономическим бедствием XXI века», а 24 марта – «Всемирным днем борьбы против туберкулеза».

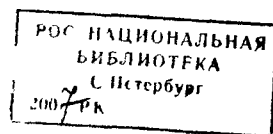
В России Постановлением правительства № 582 от 11 июня 1998 года утверждена целевая программа «Неотложные меры борьбы с туберкулезом в России на 1998-2004 годы», а Постановлением № 892 от 25 декабря 2001 г. утвержден Федеральный закон «О предупреждении распространения туберкулеза в Российской Федерации».

Известно, что основным звеном в проведении профилактических и оздоровительных мероприятий при туберкулезе животных является своевременная и точная диагностика болезни. Для прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота основным, массовым и доступным для применения в широкой ветеринарной практике методом является внутрикожная туберкулиновая проба с применением ППД-туберкулина для млекопитающих.

В настоящее время диагностика туберкулеза крупного рогатого скота имеет две основные проблемы: с одной стороны, выявление здоровых животных с парааллергическими или неспецифическими реакциями на туберкулин в благополучных хозяйствах, а с другой, недовыявление зараженных туберкулезом животных в неблагополучных хозяйствах. Поэтому, при проведении исследований на туберкулез в благополучных хозяйствах необходимо повысить специфичность, а в неблагополучных – чувствительность диагностических исследований.

Учитывая масштабность проведения исследований на туберкулез, стандартизовать организмы всех исследуемых животных по реактивности из-за различных внешних и внутренних влияний мы не можем и вряд ли это возможно, так как в разных хозяйствах с различной эпизоотической ситуацией по туберкулезу имеются разные животные с различным проявлением микобактериальной инфекции. Поэтому, прижизненная диагностика туберкулеза крупного рогатого скота на основе только аллергической внутрикожной туберкулиновой пробы в настоящее время становится недостаточной (А.Х. Найманов, 2004).

Лабораторные методы диагностики туберкулеза крупного рогатого скота являются трудоемкими, длительными (до 6 мес.) и не позволяют в короткие сроки поставить точный диагноз.



Одной из главных проблем при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота является выявление в благополучных хозяйствах реагирующих животных с парааллергическими реакциями, по причине сенсибилизации организма животных различными видами атипичных микобактерий (А.Н. Шаров, 1982, 1985; А.С. Донченко, 1991, 1997; Н.П. Овдиенко, 1991; А.Х. Найманов, 2002).

Актуальность этой проблемы увеличивается из года в год. Так, по данным официальной ветеринарной статистики, в настоящее время в благополучных по туберкулезу хозяйствах РФ выявляется в 5,3 раза больше реагирующих на туберкулин животных, чем в неблагополучных хозяйствах.

Массовые выявления парааллергических реакций на туберкулин приводят к убою большого количества реагирующих здоровых животных, что увеличивает размеры экономического ущерба и вызывает обоснованные сомнения в правильности диагностики туберкулеза общепринятыми методами.

Поэтому, оценка диагностической ценности и изучение возможности применения современных методов исследований при диагностике туберкулеза является актуальной в настоящее время.

В последние годы для выявления возбудителей некоторых инфекционных заболеваний все большее распространение получают молекулярно-биологические методы, в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР).

В 1983 г. К. Мюллис открыл принцип избирательного умножения нуклеотидных последовательностей, а в 1984 г. разработал метод ПЦР, позволяющий за несколько часов получать миллионы копий выбранного фрагмента ДНК, что приводит к накоплению ДНК в реакционной смеси.

Метод ПЦР основан на идентификации возбудителя болезни по видоспецифическому участку ДНК, позволяющий получить положительный результат при наличии в исследуемом материале единичных клеток возбудителя.

Для амплификации специфического ДНК-фрагмента методом ПЦР достаточно знать нуклеотидную последовательность двух коротких участков ДНК, окаймляющих фрагмент-мишень. На основе этих последовательностей химически синтезируют два олигонуклеотида (праймера), которые необходимы для полимеризации ДНК в каждом цикле ПЦР. Длина праймеров (обычно 20-30 нуклеотидов) должна быть такой, чтобы их последовательность была уникальна и не встречалась в других участках ДНК, присутствующей в реакционной смеси. ПЦР включает серию повторяющихся циклов. Поскольку число молекул ДНК удваивается в каждом цикле, то многократное их повторение приводит к нарастанию (амплификации) количества специфических фрагментов ДНК (ампликонов), которое затем выявляют методом электрофореза.

Преимущества ПЦР в лабораторной диагностике связаны с быстротой, высокой чувствительностью и специфичностью, что позволяет обнаруживать микроорганизмы, имеющиеся в исследуемом материале в очень малом количестве (D. Cousins et al., 1991; G. Buck et al., 1999).

Следует отметить, что в последние годы в нашей стране успешно испытаны тест-системы ПЦР при диагностике ящура, сибирской язвы, хламидиоза, классической чумы свиней и бруцеллеза.

В настоящее время проводятся исследования по изучению возможности применения полимеразной цепной реакции при диагностике туберкулеза людей и животных. Тем не менее, единого мнения об эффективности ПЦР при диагностике туберкулеза нет (D. Thierry et al., 1990, 1992; В.В. Пунга, 1998).

Поэтому, учитывая сложную эпидемиологическую и эпизоотическую ситуации по туберкулезу в нашей стране, длительность проведения и недостаточную эффективность методов диагностики туберкулеза животных, изучение возможности применения ПЦР-систем при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота является весьма актуальным.

1.2. Цель исследований. Изучить возможность применения ПЦР-системы, построенной на амплификации генетической области *senX3-regX3*, для выявления и идентификации ДНК микобактерий, при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота в благополучных и неблагополучных по туберкулезу хозяйствах и определить роль и место тест-системы *senX3-regX3* в комплексе профилактических и оздоровительных мероприятий при туберкулезе крупного рогатого скота.

1.3. Основные задачи исследований:

1. Провести испытание ПЦР-тест-системы, основанной на амплификации генетической области *senX3-regX3*, для обнаружения ДНК микобактерий и идентификации *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от других видов микобактерий.
2. Изучить влияние различных методов обработки патматериала от убитых животных на результаты ПЦР.
3. Изучить диагностическую ценность ПЦР-системы в экспериментальных условиях на зараженных *M. bovis* телках.
4. Провести сравнительную оценку диагностической ценности внутрикожной туберкулиновой пробы и ПЦР-системы в благополучных и неблагополучных по туберкулезу хозяйствах РФ.
5. Определить роль и место ПЦР-системы в комплексе профилактических и оздоровительных мероприятий при туберкулезе крупного рогатого скота.

1.4. Научная новизна.

Установлено, что ПЦР-тест-система, основанная на амплификации генетической области *senX3-regX3*, позволяет дифференцировать *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от других видов микобактерий.

Установлено, что обработка патологического материала с помощью метода А.П.Аликаевой и метода Гона-Левенштейна-Сумиоши для выявления микобактерий не влияет на результаты исследований методом ПЦР.

Установлено, что при исследовании ПЦР-методом экспериментально зараженных туберкулезом телок возбудитель *M. bovis* находится в организме зараженных животных и не обнаруживается в крови, в то же время возбудитель *M. bovis* выделяется с мочой и обнаруживается ПЦР.

Установлено, что в благополучных по туберкулезу хозяйствах при исследовании проб крови от реагирующих на туберкулин коров, ПЦР-метод дает ложноположительные показания в 16,3 % случаях. При исследовании патматериала от больных туберкулезом животных ПЦР-система дает положительные показания только в 45,5 % случаях.

Установлено, что при исследовании ПЦР-методом верхнего слоя плотной питательной среды, содержащей суспензию патматериала от больного туберкулезом крупного рогатого скота, при отсутствии роста культур микобактерий, выявляется ДНК возбудителя туберкулеза.

1.5. Практическая ценность. ПЦР-систему целесообразно использовать в лабораторной диагностике туберкулеза крупного рогатого скота для идентификации *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от других видов микобактерий и как дополнительный экспресс-метод при исследовании биоматериала от реагировавших на туберкулин и убитых с диагностической целью животных.

Результаты исследований включены в Наставление по диагностике туберкулеза животных (утверждено Департаментом ветеринарии МСХ РФ в 2002 г.).

По результатам проведенных исследований разработаны «Методические рекомендации по выявлению и дифференциации возбудителей *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от других видов микобактерий методом полимеразной цепной реакции», рассмотренные и утвержденные на заседании ученого совета ВИЭВ (2003 г.).

1.6. Основные положения, выносимые на защиту. Полученные результаты исследований позволяют вынести на защиту следующие основные положения:

1. Материалы по изучению возможности выделения культур микобактерий и дифференциации культур *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от других видов культур микобактерий методом ПЦР.
2. Результаты изучения диагностической ценности ПЦР в экспериментальных условиях на зараженных *M. bovis* телках.
3. Результаты изучения диагностической ценности ПЦР-метода в благополучных и неблагополучных по туберкулезу хозяйствах.
4. Целесообразность применения ПЦР-метода в лабораторной диагностике туберкулеза крупного рогатого скота для дифференциации культур *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от других видов микобактерий и в качестве дополнительного экспресс-метода при исследовании биоматериала от

реагировавших на туберкулин и убитых с диагностической целью животных.

1.7. Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены на:

- Международной научно-практической конференции «Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных», Москва, 2003;
- Заседании ученого совета ВИЭВ, Москва, 2003;
- Межлабораторном совещании сотрудников ВИЭВ, Москва, 2004.

1.8. Публикации результатов исследований. По материалам диссертационной работы опубликовано пять статей.

1.9. Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 147 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений и списка литературы. Список использованной литературы включает 365 наименований, из них 134 иностранных автора. Работа иллюстрирована 10 таблицами и 8 фотографиями.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований. Работа выполнена в 2000-2003 гг. в лаборатории микобактериозов ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко (ВИЭВ), в лаборатории молекулярной диагностики Института молекулярной генетики РАН, в Вышневолоцком отделе ВИЭВ, в благополучных и неблагополучных по туберкулезу хозяйствах Московской, Рязанской, Пензенской и Смоленской областей РФ.

В Институте молекулярной генетики РАН и Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко были подобраны праймеры и отработана новая диагностическая система, основанная на амплификации генетической области *sepX3-regX3* и позволяющая идентифицировать и дифференцировать *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от других видов микобактерий.

Исследования проводились в несколько этапов:

1. Исследования различных видов культур микобактерий.
2. Исследования экспериментально зараженных *M. bovis* телок.
3. Исследования в благополучных по туберкулезу хозяйствах, где установлена сенсibilизация животных атипичными микобактериями.
4. Исследования в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах.

Аллергические, бактериологические, патологоанатомические и гистологические исследования выполнены совместно с А.Х.Наймановым, И.В.Солодовой и В.С.Суворовым (ВИЭВ).

Исследования полимеразной цепной реакцией выполнены совместно с В.В.Демкиным и И.Н.Корневой (Институт молекулярной генетики РАН).

Исследования различных видов культур микобактерий проводили с целью изучения возможности дифференциации разных культур микобактерий ПЦР-методом. В работе использовали следующие музейные культуры микобактерий: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii*, *M. terrae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. marinum*, *M. phlei* и *M. scrofulaceum*.

Всего исследовали 78 культур микобактерий: 22 культуры *M. bovis*, 14 культур *M. tuberculosis* и 42 культуры различных видов атипичных микобактерий, *M. avium* и *M. paratuberculosis*.

В Вышневолоцкий отдел ВИЭВ о.Лисий из благополучного по туберкулезу хозяйства были завезены 9 шестимесячных телок. Проведено заражение 6-ти телок культурой *M. bovis* (штамм *M. bovis*-8) и 3 телки составили контрольную группу животных.

Заражение проводили алиментарно, четырехкратно в дозе 0,2 мг культуры на 1 кг живой массы при каждом заражении, т. е. каждой телке было введено 80 мг культуры *M. bovis* (штамм *M. bovis*-8). При этом культуру *M. bovis* в дозе 20 мг вводили каждому животному 3 дня подряд каждый день, через 7 дней после 3-го заражения провели четвертое заражение - в той же дозе.

Аллергические исследования подопытных телок проводили внутрикожной туберкулиновой пробой с ППД-туберкулином для млекопитающих в дозе 10000 МЕ/0,2 мл через 7, 14, 21, 35, 65, 85, 110, 140, 200, 250, 300 и 360 дней после заражения. Телок контрольной группы исследовали в те же сроки, что и зараженных. В эти же сроки от всех экспериментальных животных брали пробы крови и мочи для проведения исследований ПЦР-методом.

Через год после первого заражения все подопытные телки были убиты.

Проведен патологоанатомический осмотр убитых животных и отобран патматериал для проведения лабораторных исследований на туберкулез.

В благополучных по туберкулезу хозяйствах, где установлена сенсибилизация животных атипичными микобактериями, аллергические исследования на туберкулез проводили методом симультанной туберкулиновой пробы с использованием ППД-туберкулина для млекопитающих и КАМ. Для диагностического убоя отбирали животных с более выраженной реакцией на ППД-туберкулин для млекопитающих.

В благополучных по туберкулезу хозяйствах проведено исследование проб крови от 43 реагирующих на туберкулин коров ПЦР-методом. Проведен диагностический убой 26 реагирующих животных с последующим

патологоанатомическим и лабораторным исследованием патматериала на туберкулез.

В неблагополучных по туберкулезу хозяйствах аллергические исследования на туберкулез проводили внутрикожной туберкулиновой пробой с использованием ППД-туберкулина для млекопитающих. Реагирующими считали животных с увеличением толщины кожной складки на 3 мм и более.

В неблагополучных по туберкулезу хозяйствах проведено исследование проб крови ПЦР-методом от 83 реагирующих на туберкулин животных. Проведен убой 24 реагирующих животных с последующим патологоанатомическим, гистологическим и лабораторным исследованием патматериала от убитых коров. Лабораторное исследование патматериала от убитых животных проводили в соответствии с «Наставлением по диагностике туберкулеза животных» от 1986 г. и 2002 г.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования полимеразной цепной реакцией различных видов культур микобактерий.

При определении специфичности тест-системы *senX3-regX3* в реакциях, в которых в качестве матриц использовали ДНК различных видов микобактерий (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii*, *M. terrae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. marinum*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum*), специфические ампликоны были получены только с ДНК *M. tuberculosis* и *M. bovis*, при этом полученные ампликоны имели разные размеры *M. tuberculosis* – 370 п.н. (полинуклеотидов), *M. bovis* – 440 п.н. (полинуклеотидов), т. е. система *senX3-regX3* дифференцировала *M. bovis* от *M. tuberculosis*.

Изучение возможности дифференциации культур микобактерий тест-системой *senX3-regX3* провели на 78 культурах микобактерий (22 культуры *M. bovis*, 14 культур *M. tuberculosis* и 42 культуры различных видов атипичных микобактерий, *M. avium* и *M. paratuberculosis*).

При исследовании 22 культур *M. bovis*, специфические для *M. bovis* ампликоны размером 440 п.н. получены в 22 случаях, то есть исследуемые культуры *M. bovis* были правильно идентифицированы в 100 % случаях.

При исследовании 14 культур *M. tuberculosis* ампликоны размером 370 п.н. (*M. tuberculosis*) были обнаружены во всех 14 случаях, то есть культуры *M. tuberculosis* были правильно идентифицированы в 100 % случаях.

При исследовании 7 культур *M. avium*, ампликоны размером 370 п.н. (*M. tuberculosis*) и 440 п.н. (*M. bovis*) не были обнаружены ни в одном случае. Полученные результаты исследований позволяют считать, что тест-системой *senX3-regX3* можно дифференцировать культуры *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от культур *M. avium*.

При исследовании 6 культур *M. paratuberculosis*, специфические ампликоны для *M. tuberculosis* и *M. bovis* также не были обнаружены ни в одном случае. Полученные результаты исследований позволяют считать, что тест-системой можно дифференцировать *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от культур *M. paratuberculosis*.

При исследовании 29 культур различных видов атипичных микобактерий (5 культур *M. kansasii*, 4 культуры *M. marinum* – 1 группа по классификации Раньона; 3 культуры *M. gordonae*, 4 культуры *M. scrofulaceum* – 2 группа; 5 культур *M. terrae* – 3 группа; 3 культуры *M. fortuitum*, 5 культур *M. phlei* – 4 группа по классификации Раньона), специфические ампликоны для *M. tuberculosis* – 370 п.н. и для *M. bovis* – 440 п.н. не были обнаружены ни в одном случае.

Полученные результаты исследований позволяют считать, что тест-система *senX3-regX3* является специфичной и позволяет в 100 % случаях дифференцировать *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от *M. avium*, *M. paratuberculosis* и различных видов атипичных микобактерий 1, 2, 3, 4 группы по классификации Раньона.

Сравнительное изучение диагностической ценности ПЦР-метода и традиционных методов диагностики туберкулеза на экспериментально зараженных *M. bovis* телках.

С целью выявления начальной стадии проявления аллергических реакций на туберкулин у зараженных животных, аллергические исследования всех животных начали проводить через 7 дней после последнего заражения телок культурой *M. bovis*. В дальнейшем, аллергические исследования подопытных телок проводили внутрикожной туберкулиновой пробой с применением ППД-туберкулина для млекопитающих в дозе 10000 МЕ/0,2 мл через 14, 21, 35, 65, 85, 110, 140, 200, 250, 300 и 360 дней после заражения.

В эти же сроки от всех 9 телок брали пробы крови и мочи для проведения исследований полимеразной цепной реакцией.

Результаты сравнительного изучения динамики проявления аллергических реакций на туберкулин и выявления возбудителя туберкулеза в крови и моче экспериментальных животных ПЦР-методом представлены в таблице 1.

В начальной стадии эксперимента, то есть через 7, 14, 21, 35 и 65 дней после заражения, зараженные *M. bovis* и контрольные телки не реагировали на внутрикожную туберкулиновую пробу, и только через 85 дней 2 зараженных *M. bovis* телки (№ 8635-8636 и № 8633-8634) стали слабо реагировать на внутрикожное введение ППД-туберкулина для млекопитающих с утолщением кожной складки на 3 мм. Через 140 дней после заражения все зараженные *M. bovis* телки реагировали на внутрикожное введение ППД-туберкулина для млекопитающих, с увеличением толщины кожной складки на 5-12 мм.

Таблица 1

Сравнительная эффективность внутрикожной туберкулиновой пробы и ПЦР-метода на экспериментальных телках

Инвентар- ный номер	Исследования через (дней)																				
	85			110			140			200			250			300			360		
	В/к	ПЦР		В/к	ПЦР		В/к	ПЦР		В/к	ПЦР		В/к	ПЦР		В/к	ПЦР		В/к	ПЦР	
		кр.	мч.		кр.	мч.		кр.	мч.		кр.	мч.		кр.	мч.		кр.	мч.		кр.	мч.
Контроль: 1.8631-8631	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. 8639-8640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. 8637-8638	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Зараженные M. bovis:																					
1. 8627-8628	-	-	-	3	-	-	12	+	-	12	-	-	10	-	+	7	-	+	5	-	+
2. 8623-8624	-	-	-	-	-	-	5	-	-	5	-	-	7	+	-	6	-	-	4	-	-
3. 8625-8626	-	-	-	-	-	-	8	-	-	7	-	-	7	-	+	5	-	-	4	-	+
4. 8629-8630	-	-	-	-	-	-	5	-	-	8	-	-	6	-	-	3	+	+	7	-	+
5. 8635-8636	3	-	-	5	-	-	8	-	-	5	+	-	7	-	+	8	-	+	8	-	+
6. 8633-8634	3	-	-	7	-	-	12	-	-	10	+	-	9	-	-	7	-	+	7	-	+

Обозначения: В/к – внутрикожная туберкулиновая проба;

кр. – кровь;

мч. – моча;

- -отрицательный результат реакций;

+ -обнаружена ДНК M. bovis.

3 телки контрольной группы не реагировали на внутрикожное введение ППД-туберкулина для млекопитающих в течение всего эксперимента.

В течение первых 110 дней после заражения *M. bovis* не выявляли методом ПЦР в пробах крови и мочи. В дальнейшем *M. bovis* эпизодически, в единичных случаях, выявлялась в пробах крови у телок: № 8627-8628 - на 140 день, № 8635-8636 и № 8633-8634 - на 200 день, № 8623-8624 - на 250 день, № 8629-8630 - на 300 день после заражения. В остальные сроки исследования зараженных телок возбудитель туберкулеза в крови не определялся тест-системой *senX3-regX3*.

Резюмируя полученные результаты исследований, можно сделать вывод, что у экспериментально зараженных туберкулезом телок в крови *M. bovis* не обнаруживается с помощью использованной ПЦР-тест-системы или обнаруживается в единичных случаях. Единичные и кратковременные случаи выявления *M. bovis* в крови зараженных животных ПЦР-методом нельзя считать диагностическим признаком циркуляции возбудителя *M. bovis* в крови экспериментально зараженных туберкулезом телок.

Лучшие результаты выявления возбудителя *M. bovis* у зараженных телок ПЦР-методом были получены при исследовании мочи зараженных животных. Так, при исследовании у зараженных животных проб мочи ПЦР-тест-системой *senX3-regX3*, *M. bovis* была обнаружена у 3-х телок (№ 8627-8628, № 8625-8626 и № 8635-8636) – через 250 дней; у 4-х телок (№ 8627-8628, № 8629-8630, № 8635-8636 и № 8633-8634) – через 300 дней и у 5-ти телок (№ 8627-8628, № 8625-8626, № 8629-8630, № 8635-8636 и № 8633-8634) – через 360 дней после заражения. У телки № 8623-8624 в моче возбудитель туберкулеза не был обнаружен в течение всего опыта. То есть, первые выделения ДНК *M. bovis* из мочи зараженных животных полимеразной цепной реакцией были через 250 дней после заражения у трех телок, в дальнейшем, через 300 дней после заражения, *M. bovis* выделили у четырех зараженных телок, а в конце эксперимента возбудитель *M. bovis* выделили у пяти из шести зараженных телок. От трех животных контрольной группы возбудителя туберкулеза не выделили в течение всего эксперимента.

Из полученных результатов исследований следует, что при экспериментальном заражении туберкулезом, возбудитель *M. bovis* находился в организме зараженных животных, но не выявлялся в крови ПЦР-методом, в то же время исходная культура возбудителя *M. bovis* в 83,3 % случаях выделялась с мочой зараженных туберкулезом животных.

Через год после заражения подопытные телки были убиты с последующим патологоанатомическим осмотром и отбором патматериала для проведения лабораторных исследований на туберкулез методом ПЦР и традиционными лабораторными методами (таблица 2).

При патологоанатомическом осмотре убитых телок характерные для туберкулеза изменения (гранулемы в начальной стадии развития величиной с просьяное зерно) были обнаружены только у двух зараженных животных (№ 8635-8636 и № 8633-8634) в бронхиальном и средостенном лимфатических узлах. При гистологическом исследовании патматериала у этих животных в

бронхиальном и средостенном лимфатических узлах обнаружены отдельные гранулемы, представляющие собой узелки с округлыми краями и центром в виде некроза: хорошо выражен слой эпителиоидных, лимфоидных и гигантских клеток.

При бактериологическом исследовании патматериала от всех подопытных животных традиционным методом посева суспензии патматериала на питательные среды, рост культур *M. bovis* был обнаружен через 4-5 недель после посева патматериала на питательные среды только у 2-х из 6-ти (33,3%) зараженных телок (№ 8635-8636 и № 8633-8634).

Из патматериала убитых контрольных телок рост культур *M. bovis* не выявили.

При исследовании этой же суспензии обработанного патматериала, использованной для посева на питательные среды, ПЦР-методом системой *senX3-regX3* возбудитель туберкулеза не был выявлен ни в одном случае, независимо от метода обработки патматериала: по методу А.П.Аликаевой (исследовали взвесь патматериала) и по методу Гона-Левенштейна-Сумиоши (исследовали осадок после центрифугирования суспензии патматериала).

Учитывая слабый рост культур микобактерий на питательных средах и отрицательные результаты по ПЦР при исследовании патматериала от зараженных туберкулезом животных, мы провели дополнительные исследования ПЦР-методом верхнего слоя ранее засеянной питательной среды.

При исследовании верхнего слоя питательной среды ПЦР-методом, во всех пробах от 6 (100 %) зараженных телок был обнаружен возбудитель *M. bovis*. В контрольных пробах возбудителя туберкулеза не обнаружили.

Полученные результаты исследований показали, что возбудитель *M. bovis* находился в патматериале (в данном случае в лимфатических узлах зараженных туберкулезом животных) и в суспензии обработанного патматериала, но не выявлялся полимеразной цепной реакцией. В то же время, при исследовании ПЦР-методом верхнего слоя питательной среды, ранее засеянной суспензией обработанного патматериала, обнаруживалась ДНК исходной культуры *M. bovis* в 100 % случаях.

В дальнейшем, с целью выяснения сохранения вирулентных свойств выделенных микобактерий, мы провели заражение шести морских свинок и шести кроликов культурами микобактерий, выделенных от двух зараженных туберкулезом телок: № 8635-8636 и № 8633-8634. Через 3 месяца после заражения культурами микобактерий лабораторные животные были убиты. При патологоанатомическом осмотре убитых морских свинок и кроликов, характерные для туберкулеза изменения были обнаружены во всех случаях.

Полученные результаты проведенных исследований показали, что исходная культура возбудителя туберкулеза *M. bovis* (штамм *M. bovis*-8) сохранила свои вирулентные свойства при пассаже через телят, морских свинок и кроликов.

Таблица 2

Сравнительный анализ результатов исследований экспериментально зараженных *M. bovis* телок

№ п/п	Инвентарный номер	Реакция на туберкулин в мм (перед убоем)	Послеубойные исследования		Исследование ПЦР-методом		Исследование патматериала			Исследование верхнего слоя питательной среды ПЦР-методом
			патолого-анатомические	гистологические	крови	мочи	культуральный метод	ПЦР-метод при обработке		
								по методу Али-каевой	по методу Гона	
1.	Контроль: 8631-8632	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	8639-8640	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	8637-8638	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.	Зараженные M. bovis: 8627-8628	5	-	-	-	M. bovis	-	-	-	M. bovis
5.	8623-8624	4	-	-	-	-	-	-	-	M. bovis
6.	8625-8626	4	-	-	-	M. bovis	-	-	-	M. bovis
7.	8629-8630	7	-	-	-	M. bovis	-	-	-	M. bovis
8.	8635-8636	8	+	+	-	M. bovis	M. bovis	-	-	M. bovis
9.	8633-8634	7	+	+	-	M. bovis	M. bovis	-	-	M. bovis

Обозначения: - - без изменений или отрицательный результат реакций;
 + - наличие изменений, характерных для туберкулеза.

Изучение диагностической ценности ПЦР-метода в благополучных по туберкулезу хозяйствах, где установлена сенсибилизация животных атипичными микобактериями. Исследования провели в 12-ти благополучных по туберкулезу хозяйствах Пензенской, Рязанской и Смоленской областей, где установлена сенсибилизация животных атипичными микобактериями, то есть в хозяйствах, где при плановых аллергических исследованиях на туберкулез постоянно выявляются реагирующие на туберкулин животные с парааллергическими реакциями на туберкулин.

В этих хозяйствах аллергические исследования на туберкулез проводили методом симультанной туберкулиновой пробы с использованием ППД-туберкулина для млекопитающих и КАМ. От 43-х коров, реагирующих в большей степени на ППД-туберкулин для млекопитающих, взяли пробы крови и исследовали полимеразной цепной реакцией. При учете результатов исследований в 7 (16,3%) случаях был получен положительный результат по ПЦР-методу, то есть выделена ДНК *M. bovis*.

При дальнейшем выборочном диагностическом убое и патологоанатомическом осмотре 5 реагировавших на туберкулин и с положительными результатами по ПЦР при исследовании крови коров, характерных для туберкулеза изменений не обнаружили ни в одном случае. При лабораторном исследовании патматериала убитых животных возбудителя туберкулеза не выявили. При посеве суспензии обработанного патматериала на питательные среды, от всех 5-ти проб отмечался рост культур различных видов атипичных микобактерий. При исследовании этой же суспензии патматериала от убитых коров ПЦР-методом системой *senX3-regX3*, во всех случаях были получены отрицательные результаты.

Кроме того, в благополучных по туберкулезу хозяйствах провели диагностический убой 26 реагировавших на туберкулин коров. При патологоанатомическом осмотре убитых коров, характерных для туберкулеза изменений не обнаружили ни в одном случае. В дальнейшем провели исследования патматериала от этих 26 коров традиционными лабораторными методами исследований на туберкулез и ПЦР-методом.

При посеве суспензии патматериала, обработанного по методу А.П.Аликаевой, на питательную среду ФАСТ-3Л от 26 убитых коров в 18 (69,2 %) случаях выявили рост атипичных микобактерий. 18 культур микобактерий в дальнейшем были исследованы полимеразной цепной реакцией и во всех случаях получен отрицательный результат.

При исследовании суспензии патматериала, обработанного по методу А.П.Аликаевой и по методу Гона-Левенштейна-Сумиоши, от 26 коров ПЦР-методом, во всех случаях получены отрицательные результаты.

Таким образом, при исследовании ПЦР-методом 26 проб патматериала, обработанного по методу А.П.Аликаевой и по методу Гона-Левенштейна-Сумиоши, а также при исследовании культур микобактерий, выросших на питательной среде, система *senX3-regX3* ни в одном случае не выявила

возбудителя туберкулеза из патматериала убитых с диагностической целью коров благополучных по туберкулезу хозяйств.

Изучение диагностической ценности ПЦР-метода в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах. Изучение диагностической ценности ПЦР-метода в сравнении с другими традиционными методами прижизненной и посмертной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота, мы провели в 4-х неблагополучных по туберкулезу хозяйствах Рязанской и Московской областей.

В 2-х неблагополучных по туберкулезу хозяйствах Рязанской области от 83 реагирующих на туберкулин коров исследованы пробы крови ПЦР-методом и получены положительные результаты ПЦР в 15 (18,1%) случаях. При выборочном диагностическом убое 5-ти реагирующих на туберкулин и давших положительные показания по ПЦР животных, характерные для туберкулеза изменения были обнаружены в 2-х случаях, у остальных убитых животных характерные для туберкулеза изменения не были обнаружены. При культуральном исследовании патматериала от трех животных без видимых для туберкулеза изменений, рост культур возбудителя туберкулеза также не выявили. Однако, при постановке биопробы, лабораторные животные пали через 1 месяц после заражения с характерными для туберкулеза патологоанатомическими изменениями.

Из представленных результатов исследований следует, что наиболее достоверным показателем инфицированности туберкулезом крупного рогатого скота при исследовании патматериала от реагирующих на туберкулин животных, была и остается биопроба на лабораторных животных.

В дальнейшем, с целью выяснения диагностической ценности ПЦР-метода системы *sepX3-regX3* в сравнении с утвержденными традиционными методами посмертной лабораторной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота, провели исследования патматериала от больных туберкулезом коров.

Так, в 2-х неблагополучных по туберкулезу хозяйствах Московской области исследовали пробы патматериала от 24 реагировавших на туберкулин и убитых с диагностической целью животных (таблица 3).

При патологоанатомическом осмотре 24-х реагирующих на туберкулин животных, характерные для туберкулеза изменения были обнаружены в 22 (91,6 %) случаях. Следует отметить, что характерные для туберкулеза изменения наблюдали, в основном, в средостенных, бронхиальных и заглоточных лимфатических узлах. В некоторых случаях характерные для туберкулеза изменения обнаруживали в легких, печени и брыжеечных лимфатических узлах. В одном случае характерные для туберкулеза изменения были обнаружены в надвыменных лимфатических узлах. Отмечались и генерализованные формы поражения туберкулезом.

При дополнительном гистологическом исследовании лимфатических узлов и легких выявлены многочисленные мелкие и крупные гранулемы, имеющие

тенденцию к распространению и образующие в капсуле лимфоузлов дочерние гранулемы, а в легких вызывающие специфический плеврит.

Обнаружение у убитых животных такого большого процента характерных для туберкулеза изменений, генерализация процесса и обширность поражения лимфатических узлов и внутренних органов показало тяжелую степень поражения туберкулезом коров.

При культуральном исследовании патматериала от 24 животных был выявлен рост культур *M. bovis* в 15 (62,5 %) случаях, а в 9-ти случаях рост культур *M. bovis* не выявили.

Рост культур *M. bovis* характеризовался редкими, мелкими, гладкими, шаровидными, цвета слоновой кости колониями микобактерий.

При исследовании патматериала от 22 явно больного туберкулезом крупного рогатого скота (с характерными для туберкулеза изменениями) полимеразной цепной реакцией, положительный результат был получен в 10 (45,5 %) случаях, а культуральным методом в 15 (62,5 %) случаях, то есть ПЦР-методом туберкулез подтвержден в меньшем проценте, чем культуральным методом.

Тем не менее, ПЦР-методом дополнительно подтвержден туберкулез в трех случаях, когда из патматериала реагировавших на туберкулин коров, с характерными для туберкулеза изменениями, не была выделена культура *M. bovis* проведенными бактериологическими исследованиями.

Результаты исследований несколько зависели от метода предпосевной обработки послеубойного материала. Так, результаты исследований по ПЦР совпали в 9-ти (90 %) случаях при предпосевной обработке патматериала по методу А.П.Аликаевой и методу Гона-Левенштейна-Сумиоши.

В одном случае положительный результат по ПЦР был получен при обработке патматериала от больного туберкулезом животного по методу А.П.Аликаевой, в то время как эта же проба дала отрицательные показания по ПЦР при обработке ее по методу Гона-Левенштейна-Сумиоши.

В одном случае методом ПЦР выявили возбудителя туберкулеза при обработке патматериала методом Гона-Левенштейна-Сумиоши, но отрицательный результат по ПЦР был получен при обработке этого же материала по методу А.П.Аликаевой.

Таким образом, при предпосевной обработке патматериала по методу Гона-Левенштейна-Сумиоши, ПЦР дала положительные результаты в 10-ти случаях, и по методу А.П.Аликаевой также в 10-ти случаях.

Следует особо отметить, что лучшие результаты исследований ПЦР-методом мы получили при исследовании выделенных культур микобактерий и верхнего слоя засеянной питательной среды, где рост культур не был выявлен бактериологическим методом.

Таблица 3

Сравнительный анализ результатов исследований патматериала от реагировавших на туберкулин коров из неблагополучных по туберкулезу хозяйств

Количество исследованных животных	Методы исследования						
	В/к проба (мм)	патолого- анатомиче- ский	гистологи- ческий	культу- ральный	ПЦР-метод (система senX3-regX3)		
					патматериал, при обработке по методу:		культуры, выросшие на питательной среде ФАСТ-3Л
					А.П.Алика- евой	Гона	
24	+ 24	+ 22	+ 22	+ 15	+ 10	+ 10	+ 21
		- 2	- 2	- 9	- 12	- 12	- 1
	100 %	91,6 %	91,6 %	62,5 %	45,5 %	45,5 %	95,4 %

Примечание: В/к проба – внутрикожная туберкулиновая проба;

+ - положительный результат;

- - отрицательный результат.

Так, при исследовании выделенных культур микобактерий и верхнего слоя питательной среды при отсутствии роста культур микобактерий, *M. bovis* выявлена в ПЦР-системе *senX3-regX3* в 21 (95,4 %) из 22 случаев.

При исследовании проб патматериала от 2-х реагировавших на туберкулин и убитых коров, у которых туберкулез не был подтвержден проведенными патологоанатомическими, гистологическими и бактериологическими исследованиями, ПЦР-методом также не был обнаружен возбудитель туберкулеза.

Резюмируя весь изложенный в представленной работе материал, можно сделать общее заключение о том, что в настоящее время ПЦР-метод представляет несомненную диагностическую ценность для дифференциации *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от других видов культур микобактерий при лабораторных исследованиях. Считаем, что ПЦР-систему *senX3-regX3* целесообразно использовать для идентификации культур микобактерий, а также при послеубойной диагностике туберкулеза крупного рогатого скота, как дополнительный экспресс-метод для исследования патматериала от убитых животных при лабораторных исследованиях на туберкулез.

4. ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при исследовании различных культур микобактерий ПЦР-тест-система, основанная на амплификации генетической области *senX3-regX3*, идентифицирует *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от *M. avium*, *M. paratuberculosis* и различных видов атипичных микобактерий 1, 2, 3, 4 группы по классификации Раньона в 100 % случаях.
2. При исследовании ПЦР-методом экспериментально зараженных животных установлено, что возбудитель *M. bovis* находится в организме зараженных животных и не обнаруживается в крови. В то же время, исходная культура возбудителя туберкулеза в 83,3 % случаях выделяется с мочой зараженных животных и обнаруживается ПЦР-методом.
3. Показано, что при исследовании патматериала от экспериментально зараженных животных культуральным методом, рост культур *M. bovis* выявляется в 33,3 % случаях. При исследовании этого же материала ПЦР-методом, ДНК возбудителя туберкулеза не обнаруживается.
4. При исследовании ПЦР-методом верхнего слоя питательной среды, засеянной суспензией патматериала от зараженных туберкулезом телят, ДНК *M. bovis* выявляется в 100 % случаях.
5. Установлено, что предварительная обработка патматериала с помощью методов А.П.Аликаевой и Гона-Левенштейна-Сумиоши не влияет на результат полимеразной цепной реакции.
6. Показано, что в благополучных по туберкулезу хозяйствах, где установлена сенсibilизация животных атипичными микобактериями,

при исследовании проб крови от реагирующих на туберкулин коров, ПЦР-метод дает ложноположительные показания в 16,3 % случаях.

7. Установлено, что при исследовании патматериала от убитых с диагностической целью коров с парааллергическими реакциями и выделении у них культуральным методом в 69,2 % случаях атипичных микобактерий, ПЦР не дает ложноположительных результатов.
8. Показано, что при исследовании патматериала от больных туберкулезом коров из неблагополучных хозяйств, ПЦР-метод дает положительные результаты в 45,5 % случаях.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. ПЦР-метод целесообразно использовать для идентификации и дифференциации *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от других видов культур микобактерий.
2. ПЦР-метод может быть использован при послеубойной лабораторной диагностике туберкулеза крупного рогатого скота, как дополнительный экспресс-метод при исследовании патматериала от убитых с диагностической целью животных.

На основании результатов проведенных исследований разработаны «Методические рекомендации по выявлению и дифференциации возбудителей *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от других видов микобактерий методом полимеразной цепной реакции», рассмотренные и утвержденные на заседании ученого совета ВИЭВ (2003 г.).

6. СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Осипова Е.П., Найманов А.Х., Корнева И.Н., Демкин В.В. Использование полимеразной цепной реакции при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота. Инфекционные и протозойные болезни сельскохозяйственных животных, рыб и пчел. Труды ВИЭВ, т. 73, Москва, 2003 г. С. 107-109.
2. Корнева И.Н., Демкин В.В., Найманов А.Х., Осипова Е.П. Применение ПЦР для обнаружения микобактерий туберкулеза у животных. Научное обеспечение АПК Сибири, Монголии, Казахстана, Беларуси и Башкортостана. Материалы 5-й Международной научно-практической конференции. Новосибирск, 2002 г. С. 421-424.
3. Корнева И.Н., Осипова Е.П., Найманов А.Х., Демкин В.В. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота с применением полимеразной цепной реакции. Генодиагностика инфекционных заболеваний. Сборник тезисов 4-й Всероссийской научно-практической конференции. Москва, 2002 г. С.

4. Найманов А.Х., Овдиенко Н.П., Осипова Е.П., Солодова И.В., Суворов В.С. Полимеразная цепная реакция (система *senX3-regX3*) при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота. Материалы международной научно-практической конференции «Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных». Журнал «Ветеринарная патология», № 1-2 (9), Москва, 2004 г. С. 96-99.
5. Найманов А.Х., Овдиенко Н.П., Осипова Е.П., Солодова И.В., Суворов В.С., Корнева И.Н., Демкин В.В. Полимеразная цепная реакция (система *senX3-regX3*) при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота. Журнал «Ветеринария». В печати.

Принято к исполнению 26/05/2004
Исполнено 27/05/2004

Заказ № 234
Тираж: 100 экз.

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93
(095) 747-64-70
(095) 318-40-68
www.autoreferat.ru

РНБ Русский фонд

2007-4

4651

23 ИЮН. 2004