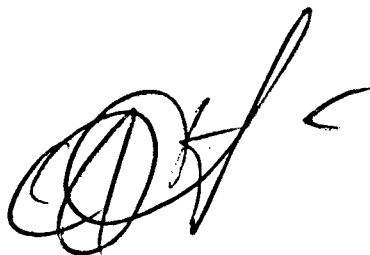


На правах рукописи

СКЛЯРОВ ОЛЕГ ДМИТРИЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СРЕДСТВ И МЕТОДОВ
ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА И КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА
ЖИВОТНЫХ**

16.00.03 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология



А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

Москва – 2006

Работа выполнена в отделе препаратов против хронических болезней животных и лаборатории молекулярной диагностики Федерального государственного учреждения "Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов" (ФГУ "ВГНКИ")

Научные консультанты:

доктор ветеринарных наук, профессор Шумилов Константин Васильевич
Заслуженный деятель науки РФ

доктор биологических наук, профессор Обухов Игорь Леонидович

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук, профессор Каврук Леонид Сергеевич
(ВНИИВСГЭ РАСХН)

доктор ветеринарных наук Альбертян Мкртич Погосович (ВНИИЭВ
им. Я.Р. Коваленко РАСХН)

доктор ветеринарных наук, профессор Белоусов Василий Иванович
(Россельхознадзор)

Ведущая организация:

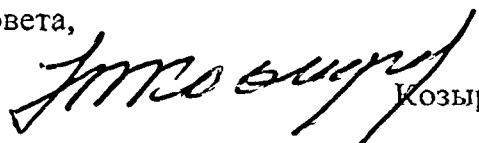
ГНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных" (СО РАСХН г. Омск)

Защита диссертации состоится " 16 " марта 2006 года
в 13³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.011.01 при ФГУ
"Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарст-
венных средств для животных и кормов" (Россия, 123022, Москва, Звенигород-
ское шоссе, д.5, ФГУ "ВГНКИ")

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ "ВГНКИ"

Автореферат разослан " 6 " февраля 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук, доцент,
Заслуженный ветеринарный врач РФ


Козырев Ю.А.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы. Бруцеллез (*Brucellosis*) и кампилобактериоз (*Campylobacteriosis*) - инфекционные болезни животных и человека, вызываемые патогенными микроорганизмами рода *Brucella* и рода *Campylobacter*.

Основой успешной борьбы с бруцеллезом и кампилобактериозом является их ранняя диагностика. Однако, особенности течения бруцеллезной инфекции, несмотря на многообразие применяемых средств и методов диагностики, не позволяют при однократном исследовании выявить всех больных бруцеллезом животных (Триленко П.А., 1976; Сочнев В.В., 1984; Косилов И.А. и др., 1999; Corbel M.J, 1997; Григорьева Г.И. и др., 1998; Ощепков В.Г. и др, 2004; и другие). Причем, бактериологическая диагностика бруцеллеза весьма трудоемкая и продолжительная по времени выполнения. Серологическая диагностика - осложняется антигенным родством между бруцеллами и другими микроорганизмами, в частности *Yersinia enterocolitica*, что обуславливает получение ложноположительных реакций, кроме того, она не позволяет дифференцировать антитела, синтезированные на полевые культуры и вакцинные штаммы бруцелл (Желудков М.М., 1981; Мельниченко Л.П., 1995; Альбертян М.П., 1996). Традиционно применяемые диагностические методы не позволяют оперативно дифференцировать бруцеллы на уровне видов и штаммов, что затрудняет проведение эпизоотологического и эпидемиологического анализа и рациональное использование средств специфической профилактики бруцеллеза.

Многое из вышеперечисленного имеет место и при диагностике кампилобактериоза животных. Тем более что выделение кампилобактерий представляет определенные трудности, обусловленные их микроаэрофильностью, капнофильностью и неспособностью выдерживать конкуренцию в смешанных культурах (Триленко П.А., 1961; Чайка Н.А., 1988; Шумилов К.В. и др., 1999).

Несовершенство диагностики бруцеллеза и кампилобактериоза на современном этапе подтверждает актуальность исследований, посвященных изучению возможности применения для диагностики этих болезней молекулярно-

генетических экспресс-методов, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

1.2. Цель и задачи исследований

Целью настоящей работы явилась разработка тест-систем для диагностики бруцеллеза и кампилобактериоза животных с помощью молекулярно-генетических методов и разработка питательной среды для кампилобактерий.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- подобрать праймеры и определить оптимальные условия проведения ПЦР с использованием культур бруцелл и кампилобактерий;
- изучить аналитическую чувствительность и специфичность ПЦР в сравнении с бактериологическими методами исследования с использованием культур бруцелл всех видов, культур кампилобактерий видов и подвидов, имеющих значение в этиологической структуре кампилобактериоза животных;
- изучить диагностическую эффективность и специфичность ПЦР в сравнении с серологическими и бактериологическими методами исследований, с использованием патологического материала от животных из хозяйств с разным эпизоотическим статусом по бруцеллезу;
- оценить возможность проведения прижизненной диагностики бруцеллеза животных методом ПЦР и применения этого метода для постановки окончательного диагноза на бруцеллез;
- адаптировать для практического применения молекулярно-генетические методы типирования бруцелл на уровне видов и штаммов;
- разработать стандартную питательную среду для кампилобактерий;
- изучить ростообеспечивающие свойства питательной среды с использованием культур кампилобактерий разных подвидов;
- изучить ростообеспечивающие свойства экспериментальной питательной среды с использованием биологического материала от животных, инфицированных кампилобактериями;
- провести сравнительное изучение свойств экспериментальной питатель-

ной среды и лучших отечественных и зарубежных аналогов.

1.3. Научная новизна

Впервые в Российской Федерации:

- разработана диагностика бруцеллеза и кампилобактериоза животных с помощью молекулярно-генетических методов;
- разработана тест-система "БРУ-КОМ" для диагностики бруцеллеза животных методом ПЦР и изучена ее аналитическая чувствительность, специфичность и диагностическая эффективность в сравнении с бактериологическими и серологическими методами;
- предложена и апробирована новая система видовой дифференциации бруцелл и идентификации вакцинного штамма *B.abortus* 19 с помощью ПЦР и ПЦР-ПДРФ анализа;
- разработана тест-система "КАМ-БАК" для диагностики и для индикации *S.jejuni.s.jejuni* и изучена ее аналитическая чувствительность и специфичность.

1.4. Практическая значимость

Внедрение в лабораторную ветеринарную практику молекулярно-генетических методов диагностики бруцеллеза с видовой и штаммовой дифференциацией бруцелл и диагностики кампилобактериоза животных, а также сконструированной нами питательной среды для кампилобактерий позволяет существенно сократить затраты времени и средств на диагностику указанных заболеваний, повысить эффективность исследований и исключить получение при этом ложноположительных результатов.

1.5. Апробация полученных результатов

Материалы диссертации доложены:

- в годовых отчетах отдела препаратов против хронических болезней животных на заседаниях Ученого совета ФГУ "ВГНКИ" в 1996-2004 гг.;
- на конференции, посвященной 100-летию открытия вируса ящура "Проблемы инфекционной патологии сельскохозяйственных животных". Владимир, 27-31 октября 1997 г.;

- на 2-й Всероссийской научно-практической конференции "Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний". Москва, 20-22 января 1998 г.;

- на Всероссийской научно-производственной конференции "Разработка и освоение производства нового поколения лекарственных средств для животных и их применение в ветеринарной практике". Ставрополь, 20-21 июня 2000 г.;

- на Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных". Минск, 2000 г.;

- на Всероссийской научной конференции "Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов", посвященной 70-летию со дня организации ВГНКИ, Москва, 14-15 февраля 2001 г.;

- на VIII съезде Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Москва, 2002 г.;

- на 4-ой Всероссийской научно-практической конференции "Генодиагностика инфекционных заболеваний". Москва, 22-24 октября 2002 г.;

- на 5-й Всероссийской научно-практической конференции "Генодиагностика инфекционных болезней". Москва, 19-21 октября 2004 г.;

- на Международной производственной конференции "Актуальные проблемы эпизоотологии на современном этапе" СПб, 2004 г.;

- на Международной научно-практической конференции "Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных". Воронеж, 21-23 сентября 2004 г.;

- на межлабораторном совещании сотрудников ФГУ "ВГНКИ". Москва, 18 октября 2005 г.

По результатам исследований составлены заключительные отчеты о НИР:

- "Разработка тест-систем с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики бруцеллеза, кампилобактериоза животных" (ВГНКИ), 2001.

- "Селекционирование штаммов *Yersinia enterocolitica* для изготовления

иерсиниозных диагностикумов и противоиерсиниозной вакцины. Разработка методов изготовления, стандартизации, контроля и применения препаратов для диагностики иерсиниоза сельскохозяйственных животных" (ВГНКИ), 2001.

Разработанные ПЦР-тест-системы и питательная среда для кампилобактерий были испытаны комиссионно:

- "Тест-система для диагностики бруцеллеза у сельскохозяйственных животных методом полимеразной цепной реакции" – 18.12.1995 г. в соответствии с распоряжением Департамента ветеринарии Минсельхозпрода РФ № 32 от 16.10.1995 г.;

- "Тест-система для диагностики кампилобактериоза (*Campylobacter jejuni*) методом полимеразной цепной реакции" – в период с 15.07.99 по 28.07.99 г. в соответствии с распоряжением Департамента ветеринарии Минсельхозпрода РФ № 2 от 13.02.1998 г.;

- "Среда питательная для кампилобактерий" - в период с 15.04.2000 по 17.05.2000 г. в соответствии с распоряжением Департамента ветеринарии Минсельхозпрода РФ № 9 от 3.04.2000 г.

1.6. Публикация результатов исследований

Материалы диссертации опубликованы в 31 научной статье.

1.7. Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 271 странице компьютерного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, выводы, практические предложения, список литературы и приложение.

Работа иллюстрирована 40 таблицами и 25 рисунками, библиографический список включает в себя 372 наименования, в том числе 183 иностранных.

1.8. Основные положения, выносимые на защиту

Чувствительность, специфичность и диагностическая эффективность тест-системы "БРУ-КОМ" в сравнении с серологическими и бактериологическими методами с использованием культур бруцелл всех видов, бактерий,

имеющих с ними антигенное родство и материала от животных из хозяйств с разным эпизоотическим статусом по бруцеллезу.

Молекулярно-генетическая дифференциация бруцелл на уровне видов и дифференциация вакцинного штамма № 19 *B. abortus* от изолятов и штаммов бруцелл разных видов.

Чувствительность и специфичность тест-системы "КАМ-БАК" с использованием культур кампилобактерий, имеющих значение в этиологической структуре кампилобактериоза животных и патологического материала от животных, инфицированных кампилобактериями.

Ростообеспечивающие свойства среды питательной для кампилобактерий (СПК) в сравнении лучшими отечественными и зарубежными аналогами.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

В работе использовали: - культуры, референтные, производственные и музейные штаммы: *Brucella abortus* 19, 82, 75/79AB, 104M, 544, 146; *B. melitensis* Rev-1, 16M; *B. suis* 1330; *B. canis* 6/66; *B. neotomae* 66/2; *B. ovis* 424/2; *Campylobacter fetus subspecies fetus* 30, 32, 322, 5396; *C. fetus subspecies venerealis* 43, Россия, 1980, 6829; *C. sputorum subspecies bubulus* 53103, ГДР, Инжир, 702T; *Yersinia enterocolitica* 0:9 S, 0:9 R; *Salmonella enteritidis* 1654; *S. enteritidis* R-6; *Escherichia coli* 1330; *Proteus vulgaris* 85/98; *Staphylococcus aureus* 209-P;

- для культивирования микроорганизмов - агаровые питательные среды;

- для приготовления буферных растворов и других реактивов - реагенты фирм "Merk", "Sigma" и стерильная деионизированная вода.

Концентрацию м.к. в суспензиях определяли по отраслевому стандартному образцу мутности на 10 Международных единиц.

В работе использовали материал (кровь, молоко, сыворотку крови, содержимое тонкого отдела кишечника, а от убитых животных - лимфатические узлы и внутренние органы) от 751 коровы, 4 баранов и 60 морских свинок.

Бактериологические и серологические исследования на бруцеллез прово-

дили в соответствии с "Наставлением по диагностике бруцеллеза животных", утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 27 марта 2000 года и 23 сентября 2003 года с изменениями и дополнениями, вытекающими из результатов собственных исследований.

Бактериологические исследования на кампилобактериоз проводили в соответствии с "Временной инструкцией о мероприятиях по диагностике, профилактике и ликвидации вибриоза крупного рогатого скота и овец", утвержденной Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 5 марта 1971 г.; идентификацию кампилобактерий проводили в соответствии с "Инструкцией по клинической и лабораторной диагностике кампилобактериоза", утвержденной Минздравом СССР 21 ноября 1989 г.

Для исследования методом ПЦР каждый образец патологического материала от животных отбирали отдельным набором инструментов.

Пробы цельной крови отбирали в пробирки с трилоном Б (ЭДТА) в соотношении 10:1 и использовали для выделения ДНК без предварительной подготовки.

Для выделения ДНК из суспендированных бактериальных клеток брали по 10 мкл суспензии, для выделения ДНК из образцов патологического материала (суспензия паренхиматозных органов и лимфатических узлов, кровь, молоко, сперма) по 100 мкл обработанного материала.

Для амплификации использовали термоциклеры "Терцик" ("ДНК-технология" Россия).

ПЦР проводили в режиме "горячего старта" (hot start).

Праймеры WboA были подобраны с помощью компьютерной программы "Oligos". Оптимизация условий ПЦР заключалась в подборе оптимальной концентрации $MgCl_2$, температуры отжига праймеров и количества циклов амплификации. На начальном этапе реакция состояла из 41 цикла, в каждом из которых цепи ДНК расплавляли при 94 °С в течение 10 сек, праймеры отжигались на матрице при 63 °С в течение 10 сек, элонгация проводилась при 72 °С в течение

ние 10 сек.

Режимы проведения ПЦР (температура отжига, количество циклов, временные параметры) являются специфичными для каждой конкретной реакции и приведены в разделе "Результаты исследования".

Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 3% агарозном геле (1,5 % для идентификации всех биоваров *B. abortus* и *B. abortus* 19) с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 5мкг/мкл. в камере для горизонтального электрофореза фирмы "Helicon" (Россия). Результаты электрофореза видеодокументировали с помощью компьютерной программы Biotest (Россия).

Ампликоны очищали методом фенольной экстракции.

Размеры ампликонов определяли с помощью маркера молекулярного веса - pUC18/HinfI (ДНК плазмиды pUC18, расщепленной рестриктазой *HinfI* на фрагменты - 1419, 517, 396, 214 п.н.).

Для проведения рестрикционного анализа использовали эндонуклеазы рестрикции *BmeI*8 и *NotI* (Сибэнзим), реакционную смесь готовили в объеме 10 мкл, из расчета на 1 реакцию: 10X рестрикционный буфер (1мкл), рестриктаза (0,5 мкл), раствор ДНК после очистки (8,5 мкл).

Смесь инкубировали 1,5-2 часа в термостате при 37 °С и подвергали электрофоретическому анализу.

Штаммы кампилобактерий идентифицировали по содержанию гуанина и цитозина (ГЦ-пар) ДНК. С этой целью на первом этапе из образцов культур была выделена ДНК. Фракционирование ДНК проводили по методу Мармура (Marmur J., 1961).

Определение содержания ГЦ пар в ДНК проводили на основе кривых плавления, используя саморегистрирующий спектрофотометр Pye Unicam SP 1800 со скоростью нагрева 0,5 град/мин. Расчеты проводили по формуле $G\% = 2,08 \times T_{пл} - 106,4$ (Owen et al, 1969).

В качестве селективной добавки использовали смесь, состоящую из по-

лимиксина (2 мг), рифампицина (10 мг), амфотерицина В (2 мг), ристомицина (10 мг) в расчете на один литр питательной среды.

2.2. Результаты собственных исследований

2.2.1. Определение чувствительности и специфичности ПЦР-тест-системы

С целью проверки чувствительности агаровые культуры штаммов 19, 82, 104М *B. abortus*, Rev-1 *B. melitensis*, 424/2 *B. ovis* и *Y. enterocolitica* серовара 0:9, суспендировали, каждую отдельно и исследовали методом ПЦР.

Согласно полученным результатам, все суспензии бруцелл с концентрацией от 10^4 до $1 \cdot 10^8$ микробных клеток (м.к.) в пробе, а также ДНК референтного штамма 544 *B. abortus* были исследованы с положительным результатом.

При исследовании проб суспензий иерсиний, физиологического раствора и ДНК тимуса быка был получен отрицательный результат.

В следующем опыте, посвященном изучению специфичности тест-системы, панель испытуемых образцов была расширена, помимо агаровых культур бруцелл разных видов и иерсиний в нее были включены пробы молока и крови, контаминированные культурой штамма 19 *B. abortus* (таблица 1).

Таблица 1

Результаты изучения специфичности ПЦР-тест-системы

№ п/п	Исследуемый материал	вид и № штамма, серовар	Кол-во м. к. в пробе	ДНК бруцелл
1	2	3	4	5
1	суспензия бруцелл	<i>abortus</i> , 19	10^4	пол.
2	суспензия бруцелл	<i>abortus</i> , 19	10^8	пол.
3	суспензия бруцелл	<i>abortus</i> , 82	10^4	пол.
4	суспензия бруцелл	<i>abortus</i> , 82	10^8	пол.
5	суспензия бруцелл	<i>abortus</i> , 104М	10^4	пол.
6	суспензия бруцелл	<i>abortus</i> , 104М	10^8	пол.
7	суспензия бруцелл	<i>melitensis</i> , Rev-1	10^4	пол.
8	суспензия бруцелл	<i>melitensis</i> , Rev-1	10^8	пол.
9	суспензия бруцелл	<i>ovis</i> , 424/2	10^4	пол.
10	суспензия бруцелл	<i>ovis</i> , 424/2	10^8	пол.
11	суспензия иерсиний	<i>Enterocolitica</i> , 0:9	10^4	отр.

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
12	суспензия иерсиний	<i>Enterocolitica</i> , 0:9	10 ⁸	отр.
13	Молоко	<i>abortus</i> , 19	10 ⁸	пол.
14	Кровь	<i>abortus</i> , 19	10 ⁸	пол.
15	Молоко	-	-	отр.
16	Кровь	-	-	отр.
17	физраствор	-	-	отр.
18	(ДНК бруцелл)	544	10 геномов	пол.
19	(ДНК тимуса быка)	-	-	отр.

Наличие ДНК бруцелл было установлено во всех пробах суспензий независимо от вида и концентрации содержащихся в них бруцелл, а также в пробах молока и крови, контаминированных бруцеллами.

Неконтаминированные пробы суспензий *Y. enterocolitica*, физиологического раствора, молока и крови были исследованы с отрицательным результатом.

С целью сравнительного изучения чувствительности ПЦР-тест-системы и бактериологического метода, исследовали пробы селезенки и печени от 14 морских свинок, убитых через 20 дней после подкожного введения культур штаммов 19 (7 голов) и 104М (7 голов) в дозе 1×10^9 м.к. (таблица 2).

Таблица 2

**Результаты сравнительного изучения чувствительности ПЦР
и бактериологического метода исследования**

№ п/п	№№ морских свинок	культура штамма	Результаты			
			ПЦР		бактериологический метод	
			Селезенка	печень	селезенка	печень
1	2	3	4	5	6	7
1	11	104М	пол.	пол.	пол.	отр.
2	12	104М	пол.	пол.	пол.	пол.
3	13	104М	пол.	пол.	пол.	пол.
4	14	104М	пол.	пол.	пол.	пол.
5	15	104М	пол.	пол.	пол.	пол.
6	16	104М	пол.	пол.	пол.	отр.
7	17	104М	пол.	пол.	пол.	пол.

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7
8	18	19	пол.	пол.	пол.	отр.
9	19	19	пол.	пол.	пол.	отр.
10	20	19	пол.	пол.	пол.	отр.
11	21	19	пол.	пол.	пол.	отр.
12	22	19	пол.	пол.	пол.	пол.
13	23	19	пол.	пол.	пол.	пол.
14	24	19	пол.	пол.	пол.	пол.
15	25	-	отр.	отр.	отр.	отр.
16	ДНК	544	пол.		-	-
17	ДНК тимуса быка		отр.		-	-

Наличие ДНК бруцелл установлено в пробах селезенки и печени от всех иммунизированных морских свинок.

Культура бруцелл была выделена из проб селезенки от всех инфицированных морских свинок и из проб печени от 50 % опытных морских свинок - №№ 12, 13, 14, 15, 17, 22 и 23.

При исследовании проб материала от контрольной (неиммунизированной) морской свинки тем и другим методом был зарегистрирован отрицательный результат.

Комиссионное изучение чувствительности и специфичности ПЦР-тест-системы было проведено с использованием панели из 52 проб материала (рис. 1).

Анализ данных электрофореграммы показывает, что методом ПЦР выявлено наличие ДНК бруцелл во всех контаминированных пробах физиологического раствора (№№ 1-10), молока (№ 11) и крови (№ 12).

Наличие ДНК бруцелл установлено также в пробах селезенки (№№ 8, 10, 16, 18, 26, 28, 34, 36, 40, 42, 46, 48) от 12 (80 %) и в пробах печени (№№ 9, 33, 35, 41, 47) от 5 (33 %) морских свинок. Положительный результат был зарегистрирован при исследовании контрольного препарата ДНК штамма *B. abortus* 544 (K+).

ДНК бруцелл не была обнаружена при исследовании суспензий нерсиний (№№ 21, 22), неконтаминированного бруцеллами физиологического раствора (№ 2), молока (№ 50) и крови (№ 52), а также материала от неиммунизированной

ных животных (№№ 23, 24, 31, 32).

Культуры бруцелл были выделены из проб селезенки (№№ 28, 34, 36, 40, 46, 48) от 6 (40 %), из проб печени (№№ 33, 47) от 2 (13 %) из 15 инфицированных морских свинок.

Наличие бруцелл в пробах материала (№№ 16, 18, 26, 35, 39, 41) от 6 (40 %) морских свинок было подтверждено только методом ПЦР.

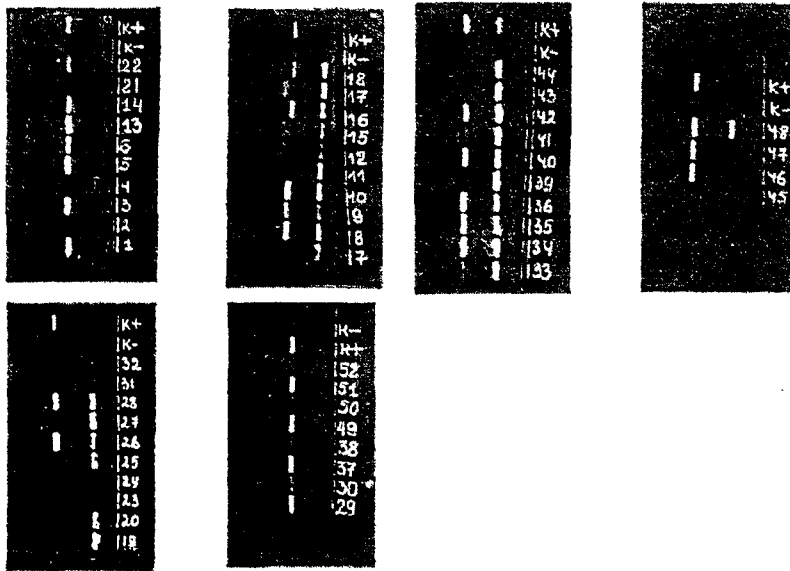


Рис. 1. Результаты испытания ПЦР-тест-системы

2.2.2. Изучение возможности применения ПЦР-тест-системы для прижизненной диагностики бруцеллеза

Пробы крови, молока и спермы, содержащие 1, 5, 10 м.к. штамма 75/79-AB *B. abortus*, исследовали методом ПЦР в трех, а 10^2 , 10^3 , 10^4 и 10^5 - в двух повторностях (рис. 2).

Согласно результатам электрофореграммы, ДНК бруцелл обнаружена в одной пробе крови из трех, содержащих 1 микробную клетку, в одной пробе из трех, содержащих 5 м.к., в одной пробе из трех, содержащих 10 м.к. и во всех пробах, содержащих 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 м.к.

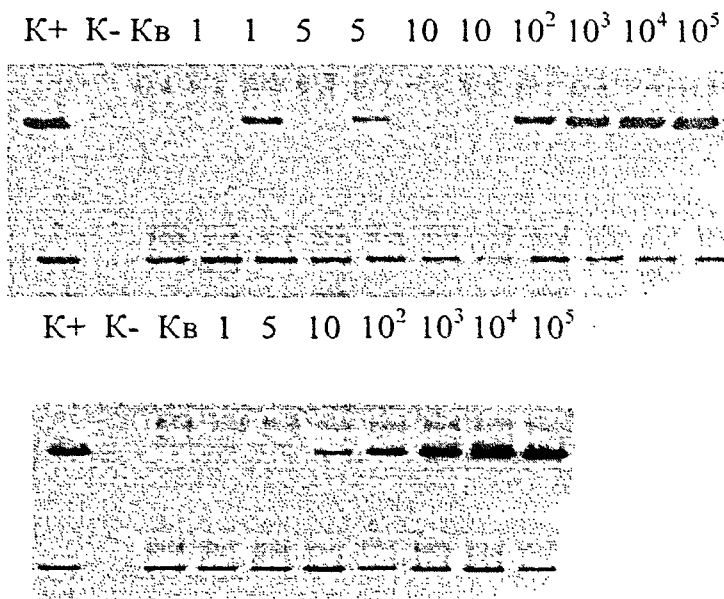


Рис. 2. Результаты ПЦР-анализа проб крови

Результаты повторного исследования проб крови приведены на рисунке 3.

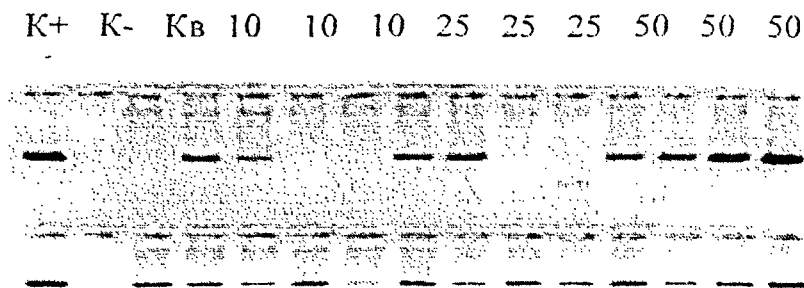


Рис. 3. Результаты повторного ПЦР-анализа проб крови

Анализ электрофореграммы позволяет увидеть, что ДНК бруцелл выявлена в двух пробах из трех, содержащих 10 м.к.; в двух пробах из трех, содержащих 25 м.к.; в одной пробе из трех, содержащих 50 м.к. и в пробах, содержащих 10², 10³, 10⁴ м.к..

Результаты исследования проб молока, контаминированного бруцеллами представлены на рис. 4. Согласно данным электрофореграммы ДНК бруцелл была выявлена в двух пробах молока из трех, содержащих 10 м.к., и во всех пробах, содержащих 10, 25, 50, 10², 10³, 10⁴ м.к.

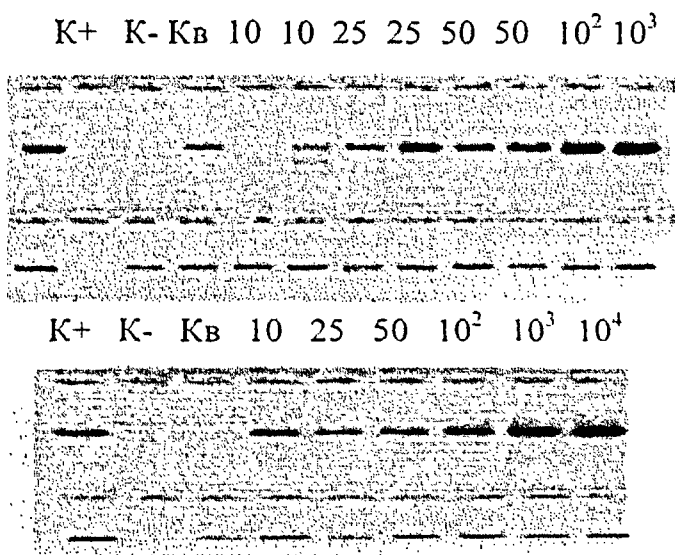


Рис. 4. Результаты ПЦР-анализа проб молока

При исследовании спермы наличие ДНК бруцелл было зарегистрировано в пробах, в которые было внесено 10², 10³ и 10⁴ м.к. (рис. 5).

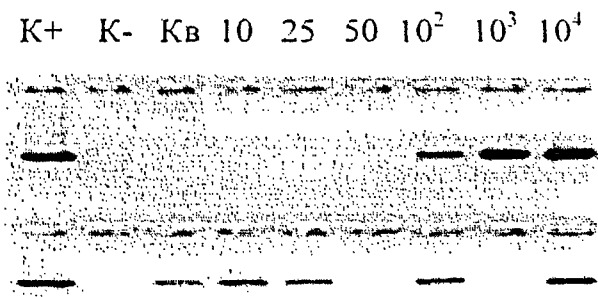


Рис. 5. Результаты ПЦР-анализа проб спермы

В следующем опыте, в отличие от предыдущего, сперму не обрабатывали Tween 20. Результаты исследования представлены на рисунке 6.

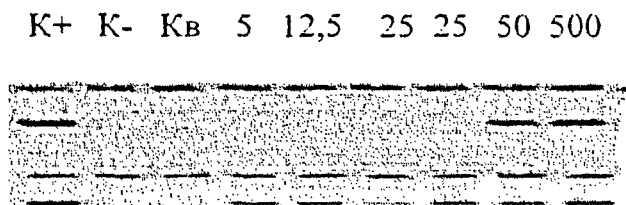


Рис. 6. Результаты повторного ПЦР-анализа проб спермы

Согласно результатам электрофореграммы, ДНК бруцелл выявлена в пробах, содержащих $0,5 \cdot 10^2$ и $5 \cdot 10^2$ м.к.

Для изучения возможности проведения прижизненной диагностики бруцеллеза у животных методом ПЦР, были исследованы пробы крови от 17 морских свинок через 48 дней после иммунизации вакциной из штамма *B.abortus* 19 в дозе 1 млрд м.к. Наличие ДНК бруцелл было зарегистрировано в 10 пробах крови, что составило 58,8 % от общего количества исследованных проб.

Результат исследования проб крови культуральным методом был отрицательным.

2.2.3. Изучение чувствительности и специфичности ПЦР-тест-системы "БРУ-КОМ" в производственных условиях

При серологическом исследовании в Каширской ветеринарной лаборатории Московской области были выявлены две коровы из ТОО "Красная Звезда" Каширского района - хозяйства, благополучного по бруцеллезу, в сыворотке крови которых содержались агглютинины в количестве 100 МЕ/мл и 50 МЕ/мл соответственно. При исследовании, выполненном через 30 дней, результаты не изменились.

С целью исключения заражения бруцеллезом животные были убиты. Из лимфатических узлов и внутренних органов коров, а также пробы печени и селезенки 3-х месячного плода коровы № 2 были сделаны бактериологические посевы. Методом ПЦР исследовали по 7 проб патологического материала от каждой коровы в связи с тем, что пробы части лимфоузлов были объединены. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Выделить культуру и ДНК бруцелл из материала не удалось. Однако, на иерсиниозном селективном агаре СМ 653 фирмы "Oxoid", засеянном пробой из селезенки плода коровы № 1 (Марта), выросла культура, представленная грамотрицательными полиморфными кокковидными подвижными бактериями.

Таблица 3

Дифференциально-диагностическое исследование на бруцеллез и иерсиниоз коров ТОО "Красная Звезда"

Номер, кличка	Бруцеллез					Иерсиниоз			
	РА	РСК	РБП	РИД	Культуральный / ПЦР	РА	РИД		Культуральный
	Антиген					Антиген (Y. enterocolitica)			
	единый для РА, РСК и РДСК		Роз бенгал	О-ПС		09-S	09-R	09 SR	
1. Марта	1/50 (2)	-	-	-		- / -	-	1/100 (2)	
2. Ночка	1/100 (2)	-	-	-	- / -	-	1/100 (2)	+	-
40 коров	-	-	-	-	0 / 0	24 (1-4)	-	9 +	-

Примечание. (1, 2, 3, 4) - оценка реакции в крестах: (+) - положительный результат; (-) – отрицательный результат; (0) – не исследовали.

В пластинчатой РА культура агглютинировалась иерсиниозной сывороткой, полученной на культуру штамма Y. enterocolitica 09-R. При серологическом исследовании проб сыворотки крови от 40 коров данного стада, значительная часть их положительно реагировала с иерсиниозными антигенами.

В целом, полученные результаты исследований позволили исключить факт заражения бруцеллезом животных ТОО "Красная Звезда" и свидетельствовали о специфичности тест-системы "БРУ-КОМ".

В благополучной по бруцеллезу Смоленской области при трехкратных ежемесячных серологических исследованиях Областной ветеринарной лабораторией были выявлены 5 коров из разных хозяйств, положительно и сомнительно реагирующих на бруцеллез (таблица 4).

Результаты бактериологического и ПЦР исследований с использованием проб крови, селезенки, печени, лимфатических узлов и содержимого тонкого отдела кишечника оказались отрицательными.

Пробы сыворотки крови от этих коров реагировали положительно с иерсиниозными антигенами. Из материала от коров №№ 3 и 4 были выделена культура, отнесенная по результатам типирования к IV биовару *Yersinia enterocolitica*.

Таблица 4

**Результаты исследования на бруцеллез и персониоз коров
из хозяйств Смоленской области**

Номер, кличка	РА	РСК	РБП	РИД	Культуральный / ПЦР	РА		РИД	Культуральный
	Антиген бруцеллезный					Антиген (Y.enterocolitica)			
	единый для РА, РСК (РДСК)		Роз бен гал	О-ПС		09-S	09-R	09 SR	
1. Цыганка	1/50 (2)	-	-	-	- / -	1/200(2)	-	+	-
2. Суббота	1/50(3)	-	-	-	- / -	-	1/50 (2)	-	-
3. Заря	1/200(2)	-	-	-	- / -	1/100(2)	1/100(2)	+	+
4. Розалия	1/50 (2)	-	-	-	- / -	1/400(2)	1/100(2)	+	+
5. Козочка	1/50(2)	-	-	-	- / -	1/200(2)	1/50(2)	-	-

Примечание. (2, 3) - оценка реакции в крестах; (+) - положительный результат; (-) – отрицательный результат.

Таким образом, результаты ПЦР-анализа и бактериологического исследования позволили исключить заражение коров в хозяйствах Смоленской области бруцеллезом, что подтверждает специфичность ПЦР-тест-системы.

В Волгоградской области исследование проводили с использованием материала от трех коров СПК «Верхнее-Бузиновское» Клетского района, неблагополучного по бруцеллезу, с целью уточнения диагноза.

Две коровы положительно реагировали на бруцеллез при исследовании через 15, а затем и через 30 дней после введения антигена "БИВ" для выявления латентных форм бруцеллеза. Третья корова № 30 была исследована с целью контроля специфичности метода ПЦР, так как не реагировала на бруцеллез ни до, ни после введения антигена.

Сыворотку крови, полученную от животных перед убоем, исследовали в РА, РСК, РНГА и РИД. Патологический материал исследовали культуральным методом и с помощью биопробы, а также методом ПЦР. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Как видно из материалов таблицы, проба сыворотки крови от коровы №

30/63 была исследована с сомнительными результатами в РА (50 МЕ/мл ++) и РСК (1/5 +) и с положительным в РНГА 1/400 (4); корова № 83 реагировала положительно по данным РСК (1/5 ++++) и сомнительно в РНГА 1/100 (2 ++).

Корова № 30 оказалась серонегативной по бруцеллезу.

Выделить культуру бруцелл из проб патматериала от животных не удалось, также отрицательными были результаты биопробы.

ДНК бруцелл была выявлена в 7 образцах из 10 от коров № 30/63 и № 83. Материал от контрольного животного № 30 был исследован в ПЦР с отрицательным результатом.

Таблица 5

**Результаты исследования на бруцеллез коров из
СПК "Верхнее-Бузиновское"**

№ п/п	Инв №	РА	РСК	РНГА	РИД	Культуральный / биопроба	ПЦР
1	30/63	1/50 (2)	1/5 (1)	1/400 (4)	+	- / -	+
2	83	-	1/5 (3)	1/100 (2)	-	- / -	+
3	30	-	-	-	-	- / -	-

Примечание: (1, 2, 3, 4) - оценка реакции в крестах; + - положительный результат; (-) – отрицательный результат.

ПЦР-анализ подтвердил результаты серологического исследования и позволил окончательно доказать, что эти животные больны бруцеллезом.

В Краснодарском крае в работе использовали материал от коров колхоза-племзавода "Россия" Красноармейского района Краснодарского края. При серологическом исследовании неиммунизированных против бруцеллеза 704 коров, реагировали на бруцеллез положительно - 9 голов и сомнительно - 5 голов. От всех коров, положительно и сомнительно реагирующих на бруцеллез, перед убоем были взяты пробы крови и молока, которые исследовали культуральным методом и методом ПЦР.

Семь коров, из которых пять согласно результатам предубойного серологического исследования реагировали на бруцеллез положительно и две – со-

многочисленно, были убиты. Бактериологические посевы были сделаны из лимфатических узлов и внутренних органов от коров. ПЦР-анализ этого же материала на бруцеллез, а также на наличие ДНК возбудителя кишечного иерсиниоза проводили соответственно с помощью тест-систем "БРУ-КОМ" и "ЭНТЕРКОЛ" (таблица 6).

Таблица 6

Результаты исследования на бруцеллез и иерсиниоз проб сыворотки крови, молока, лимфатических узлов и внутренних органов коров

Инв. ном.	РА	РСК	РПБ	ИФА 0,244	РНГА 1:200 +++	КР (молоко)	ПЦР/бак.исследование			ПЦР "Энтеркол"
							мол	кровь	Л.узлы, Внутр. органы	
99	+	+	+	+	+	-	+/-	+/-	+10/+4	-
3787	+	+	+	+	+	-	+/-	+/-	Не иссл.	-
3466	+	+	+	+	+	-	-/-	+/-	+3/+1	-
3113	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	Не иссл.	-
3260	+	+	+	+	+	-	+/-	-/-	+12/+7	-
3471	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	Не иссл.	-
2344	-	-	-	+	-	-	+/-	+/-	Не иссл.	-
230	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	-/-	-
3089	+	10+	+	+	+	+	+/-	+/-	Не иссл.	-
3457	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+1/-	-
3491	+	40+	+	+	+	+	+/-	+/-	+8/+2	-
3699	50	-	+	-	+	-	+/-	+/-	Не иссл.	-
3157	-	-	-	+	-	-	+/-	+/-	+3/+1	-
3572	100+	-	+	+	+	-	+/-	+/-	Не иссл.	-
Всего:	10	8	10	11	11	5	10/-	12/-	(6) 37- 40,4 % /	-
Пол.									(5) 15- 15,3 %	
Сомн.	1	-	-	3	1	-	-/-	-/-	-	-

Наличие ДНК бруцелл было выявлено в пробах молока от 10 из 11-исследованных животных (три коровы не лактировали) и в пробах крови от 12 из 14 коров. С учетом совпадения положительных результатов при исследовании ряда проб, все 14 коров были признаны больными. Выделить культуру бруцелл из молока и крови не удалось.

При исследовании в ПЦР 7 коров из 14 наличие ДНК бруцелл было зарегистрировано в материале от 6 коров, а культуру бруцелл выделили из материала от 5 коров.

Всего при исследовании 94-х проб материала от этих животных наличие ДНК бруцелл было выявлено в 38 пробах, что составило 40,4 %, тогда как культуру бруцелл выделили из 15 проб (15,3 %). Все положительные результаты бактериологического и серологического исследований были подтверждены положительными результатами исследования материала методом ПЦР.

Для сравнения чувствительности тест-системы "БРУ-КОМ" и бактериологического метода исследования полученные данные подвергли статистической обработке. Вычисленная величина χ^2 (13,88) превышает табличное значение χ^2_{01} и позволяет считать с надежностью более 99 %, что тест-система "БРУ-КОМ" превосходит по чувствительности бактериологический метод исследования.

Из лимфатических узлов ДНК бруцелл выделяли значительно чаще, чем из внутренних органов. Вычисленная величина превышала табличное значение $\chi^2_{10} = 4,61$ (при $\nu=2$), что давало право отвергнуть нулевую гипотезу, но риск ошибки этого вывода (10 %) оказался слишком велик. В связи с этим нельзя с уверенностью утверждать, что при выборе объекта для исследования методом ПЦР следует отдавать предпочтение лимфатическим узлам.

При исследовании материала от убитых коров на кишечный иерсиниоз с помощью тест-системы «ЭНТЕРКОЛ» был получен отрицательный результат.

2.2.4. Идентификация вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 методом АМОС-ПЦР

Для идентификации штамма 19, основанной на делеции специфического участка в области гена *Eg1* у данного штамма, использованы праймеры, подобранные таким образом, что один из них отжигается в области локуса *Eg1*, общего для штамма 19, штаммов и культур вида *abortus* и других видов бруцелл, а другой - в области гена, имеющейся у всех бруцелл кроме штамма 19 (рис. 7).

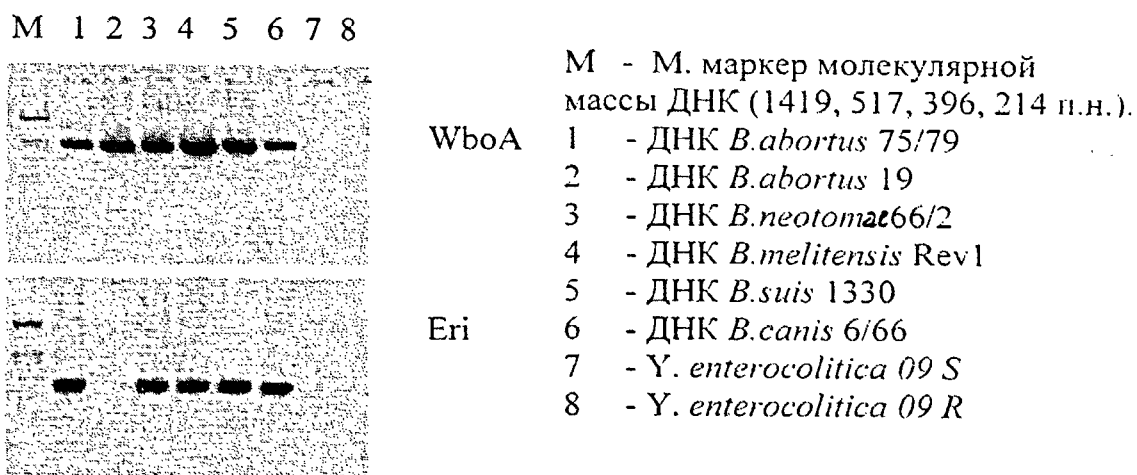


Рис. 7. Идентификация штамма *B. abortus* 19

В результате, при параллельном тестировании методом ПЦР с праймерами WboA ДНК штаммов бруцелл всех видов, и в том числе штамма для 19, амплифицируется специфический фрагмент для каждого из них, а при тестировании этого же материала с праймерами Eri - для штаммов бруцелл всех видов, за исключением штамма 19.

2.2.5. Дифференциация видов бруцелл, основанная на полиморфизме расположения в геноме бруцелл элемента IS711

Для выявления *B. melitensis* (все биовары), *B. ovis*, 1, 2 и 4 биоваров *B. abortus* и первого биовара *B. suis* использовался метод AMOS, аббревиатура от *abortus, melitensis, ovis* и *suis*. Метод основан на видо - или биовар - специфических особенностях локализации генетического элемента IS711 в хромосомальной ДНК бруцелл этих видов. Для увеличения чувствительности данного метода условия проведения ПЦР были оптимизированы.

Реакция состояла из 35 циклов, в каждом из которых цепи ДНК расплавлялись при 94 °С в течение 20 сек, температура отжига праймеров варьировалась, праймеры отжигались на матрице в течение 20 сек, элонгация проводилась при 72 °С в течение 40 сек.

При определении оптимальной температуры отжига праймеров в пределах 56,5-60 °С, чувствительность и специфичность реакции при разных темпе-

ратурных режимах отжига праймеров не изменялись. Хотя, согласно результатам тестирования образцов крови от 5 морских свинок, отобранной через 20 дней после введения штамма *B. abortus* 19, оптимальной оказалась температура отжига праймеров 60 °С.

В итоге выполненной работы были определены оптимальные условия AMOS-ПЦР:

Условия 1		Условия 2	
94 °С – 0 мин. 20 с	} 35 циклов	94 °С – 0 мин. 10 с	} 42 цикла
60 °С – 0 мин. 20 с		60 °С – 0 мин. 10 с	
72 °С – 0 мин. 40 с		72 °С – 0 мин. 10 с	

Результаты проверки специфичности метода AMOS на культурах штаммов бруцелл и бактерий, имеющих с ними антигенное родство, приведены на рисунке 8.

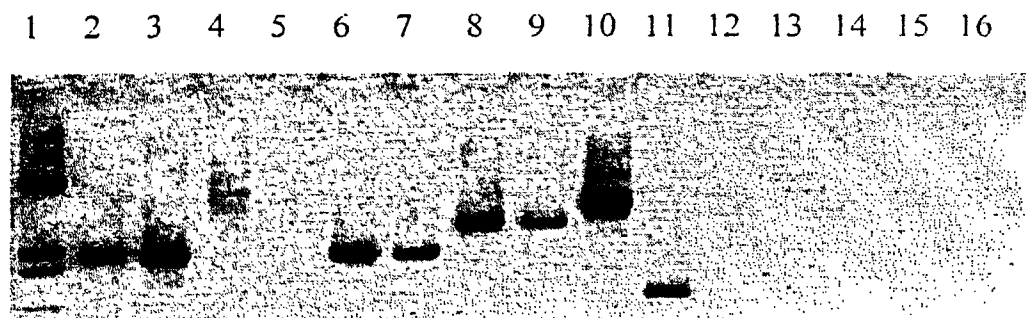


Рис. 8. Проверка специфичности метода AMOS-ПЦР

1. маркеры молекулярной массы ДНК (1419, 517, 396, 214 п.н); 2. *B. abortus* 544; 3. *B. abortus* 146; 4. *B. abortus* 75/79 АВ; 5. *B. abortus* 82; 6. *B. abortus* 19; 7. *B. abortus* 104 М; 8. *B. melitensis* 16 М; 9. *B. melitensis* Rev-1; 10. *B. ovis* 424/2; 11. *B. suis* 1330; 12. *B. neotomae* 66/2; 13. *B. canis* 6/66; 14. *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* (702.Т); 15. *Camp. sputorum* s. *bubulus* 53103; 16. *Yersinia enterocolitica* 0:9.

В ходе ПЦР с использованием пяти праймеров, один из которых специфичен к последовательности элемента IS711, а четыре другие - к соседним с ним участкам ДНК, специфичным для каждого вида бруцелл, при тестировании штаммов *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis* амплифицировались специфические фрагменты размером 731, 976, 285 п.н. соответственно.

Специфический продукт ПЦР-анализа ДНК *B. abortus* составил - 498 п.н. и регистрировался только в отношении ДНК 5 из 7 используемых штаммов бруцелл.

2.2.6. Практическое применение AMOS-ПЦР

Одним из первых случаев практического применения метода AMOS-ПЦР было исследование смеси лимфатических узлов и семенников, которые были объединены в общие пробы от четырех баранов СПК «Правда», серопозитивных по инфекционному эпидидимиту. При тестировании всех проб патологического материала в AMOS-ПЦР амплифицировался специфический для *B. ovis* фрагмент размером 976 п.н. (рис. 9).

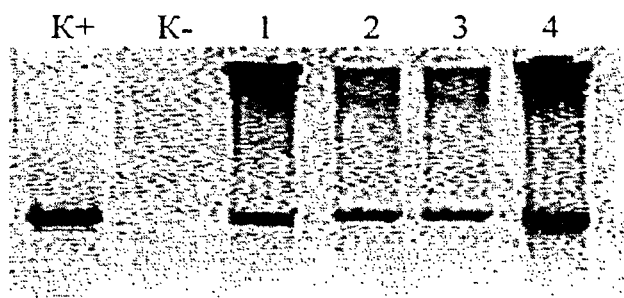


Рис. 9. Результаты AMOS-ПЦР-анализа патологического материала от баранов, серопозитивных на инфекционный эпидидимит

2.2.7. Дифференциация всех биоваров *B. Abortus*

Для идентификации всех биотипов *B. abortus* был использован метод, основанный на факте отсутствия в хромосомной ДНК бруцелл вида *abortus* фрагмента длиной примерно 25 т.п.н., который имеется у других видов бруцелл и в состав которого входит ген *omp31*.

Подобранные праймеры отжигали участки ДНК, фланкирующие область размером 25 т.п.н., присутствующую у бруцелл всех видов, за исключением *B. abortus*. В итоге, при тестировании ДНК *B. abortus* амплифицировался фрагмент, размером 1054 п.н., а при анализе остальных видов бруцелл, амплификация теоретически возможного фрагмента размером примерно 26 тыс. п.н. не регистрировалась (рис. 10).

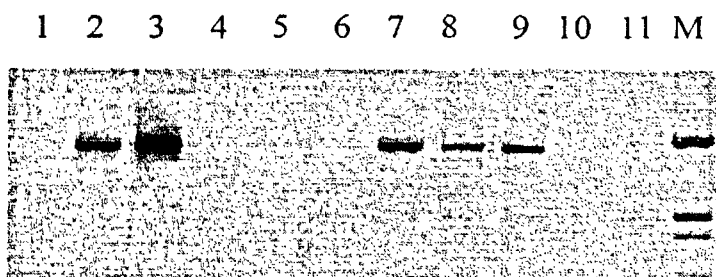


Рис. 10. Проверка специфичности праймеров Vabor

1. отрицательный контроль; 2. *B. abortus* 544; 3. *B. abortus* 146; 4. *B. melitensis* 16 M; 5. *B. canis* 6/66; 6. *B. ovis* 424/2; 7. *B. abortus* 75/79; 8. *B. abortus* 82; 9. *B. abortus* 19; 10. *B. neotomae* 66/2; 11. *B. suis* 1330; M - маркер молекулярной массы ДНК (1419, 517, 396, 214 п.н).

2.2.8. Использование анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов генов бруцелл для дифференциации *B. canis* и *B. neotomae*

Для генетического типирования *B. canis* и *B. neotomae* использовали анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДРФ) генов, кодирующих белки внешней оболочки бруцелл *omp31* и *omp2b*. Этот метод основан на полиморфизме одиночных нуклеотидных замен в исследуемых генах. Для проведения ПДРФ анализа исследуемый ген амплифицировали с помощью ПЦР и затем продукт амплификации обрабатывался определенной эндонуклеазой рестрикции (рестриктазой).

С помощью программы Vector NTI Suite 5.5 был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *omp31* и *omp2b* из баз данных DDBJ/EMBL/GenBank для разных видов бруцелл. При сравнении нуклеотидных последовательностей гена *omp31* разных видов бруцелл для дифференциации вида *B. canis* была выбрана эндонуклеаза рестрикции *Bme* 18.

С целью дифференциации вида *B. neotomae* от других видов бруцелл, на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена *omp2b*, для проведения ПДРФ анализа была выбрана эндонуклеаза рестрикции *Hae* III.

2.2.9. ПЦР-ПДФ анализ гена *omp31*

Для амплификации гена *omp31* использовали праймеры 31sd и 31ter.

В результате для ДНК бруцелл видов *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae* амплифицировался продукт, размером 881 п.н. (рис. 11).

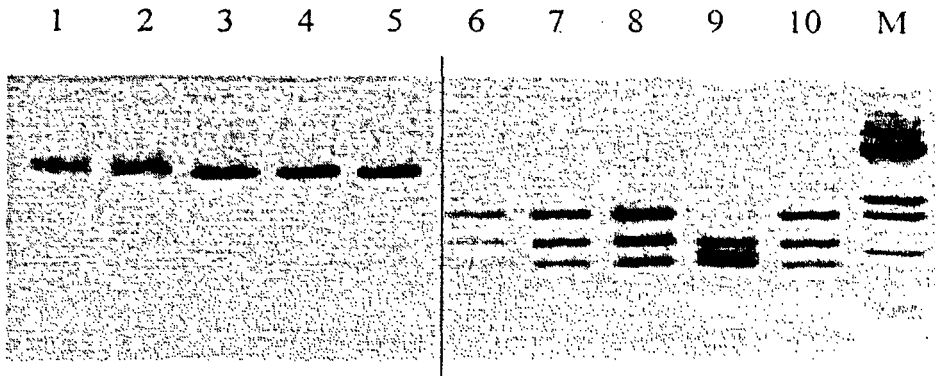


Рис. 11. Профили рестрикции ПЦР фрагментов, полученных при обработке продуктов амплификации гена *omp31* эндонуклеазой рестрикции *Bme18*. 1-5. очищенные ПЦР-продукты: 1. *B. neotomae* 66/2; 2. *B. suis* 1330; 3. *B. melitensis* 16 М; 4. *B. canis* 6/66; 5. *B. ovis* 424/2; 6-10. ПЦР продукты, обработанные рестриктазой: 6. *B. neotomae* 66/2; 7. *B. suis* 1330; 8. *B. melitensis* 16 М; 9. *B. canis* 6/66; 10. *B. ovis* 424/2; М - маркер молекулярной массы ДНК (1419, 517, 396, 214 п.н).

Так как ген *omp31* входит в состав протяженной области размером 25 т.п.н., отсутствующей в геноме *B. abortus*, специфический продукт для всех биоваров *B. abortus* не образуется.

Затем продукты амплификации гена *omp31* обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Bme 18*. в результате для ДНК *B. canis* выявлялись пять фрагментов размером 263, 218, 193, 183, 24 п.н, в отличие от других видов, где выявлялись фрагменты размером 411, 263, 183, 24 п.н.

2.2.10. ПЦР-ПДФ гена *omp2b*

В результате амплификации гена *omp2b* всех видов бруцелл с использованием праймеров 2bА и 2bВ (209) для каждого из них был получен специфический фрагмент размером 1251 п.н. (рис. 12).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

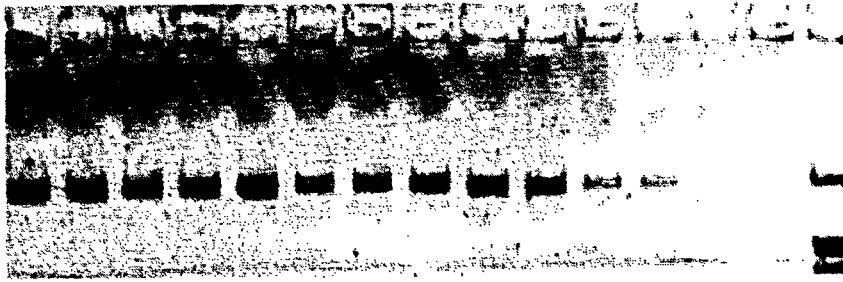


Рис. 12. Продукты амплификации гена *omp 2b* бруцелл и бактерий, имеющих с ними антигенное родство.

1. *B. neotomae* 66/2; 2. *B. suis* 1330; 3. *B. abortus* 544; 4. *B. abortus* 146; 5. *B. melitensis* 16 M; 6. *B. canis* 6/66; 7. *B. ovis* 424/2; 8. *B. abortus* 75/79; 9. *B. abortus* 82; 10. *B. abortus* 19; 11. *B. abortus* 104 M; 12. *B. melitensis* Rev-1; 13. *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* (702.T); 14. отрицательный контроль выделения ДНК; 15. маркер молекулярной массы ДНК (1419, 517, 396, 214 п.н).

После обработки продуктов амплификации специфического участка гена *omp2b* эндонуклеазой рестрикции *HaeIII* было установлено, что ДНК- продукт *B. neotomae* имеет только один сайт рестрикции, в результате чего на геле электрофореза наблюдаются 2 фрагмента размером 723 и 513 п.н. тогда как у других видов имеются дополнительные сайты рестрикции и выявляются фрагменты размером 725, 345, 168 п.н. для *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* и 523, 420, 318 п.н. для *B. ovis* (рис. 13).

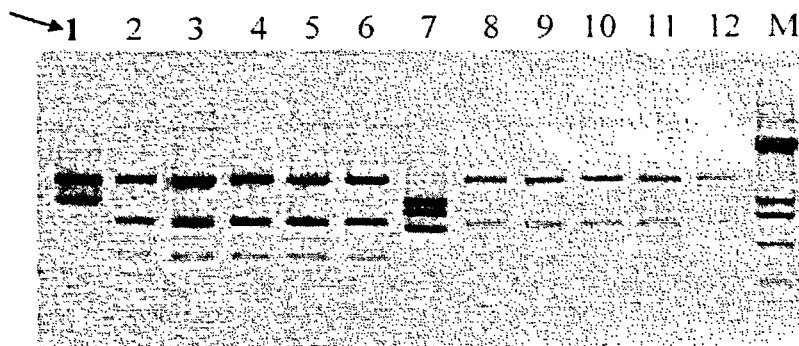


Рис. 13. Профили рестрикции ПЦР фрагментов, полученных при обработке продуктов амплификации гена *omp2b* эндонуклеазой рестрикции *HaeIII*

1. *B. neotomae* 66/2; 2. *B. suis* 1330; 3. *B. abortus* 544; 4. *B. abortus* 146; 5. *B. melitensis* 16 M; 6. *B. canis* 6/66; 7. *B. ovis* 424/2; 8. *B. abortus* 75/79; 9. *B. abortus* 82; 10. *B. abortus* 19; 11. *B. abortus* 104 M; 12. *B. melitensis* Rev-1; M - маркер молекулярной массы ДНК (1419, 517, 396, 214 п.н).

2.2.11. Разработка тест-системы для выявления *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni*

Первым этапом исследований, посвященных разработке метода идентификации кампилобактерий с использованием ПЦР, был поиск нуклеотидных последовательностей генома *Campylobacter jejuni* в базах данных Entrez (Национальный центр биотехнологической информации, Национальная медицинская библиотека, Национальный институт здоровья, США), GeneBank, EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека) и DDBJ (Японской базе данных нуклеотидных последовательностей).

Всего было проанализировано около 400 нуклеотидных последовательностей гена *omp*.

На втором этапе было проведено выравнивание отобранных нуклеотидных последовательностей с помощью системы ClustalW Multi Sequence Alignment с целью их последующего анализа на варибельность и поиска консервативных участков, необходимых для выбора праймеров.

На третьем этапе была изучена специфичность предложенных праймеров с помощью компьютерных программ FASTA и BLASTA *on line*. В результате этой работы была показана гомология выбранных олигонуклеотидов только с геном *omp* и не обнаружено их значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями других бактерий.

Таким образом, выбранные праймеры, исходя из теоретических расчетов, должны были обладать 100% специфичностью. Длина амплифицируемого участка составляет 606 п.н.

2.2.12. Изучение чувствительности и специфичности ПЦР при выделении ДНК кампилобактерий подвида *jejuni*

Цикл ПЦР составляли: денатурация ДНК, отжиг праймеров и элонгация комплементарных цепей ДНК. Денатурацию ДНК проводили при температуре 91-95 °С в течение 1 минуты. Отжиг праймеров - при 45-65 °С в течение 1 минуты. Элонгация комплементарных цепей ДНК проходила при 70-72 °С с использованием *Taq*-полимеразы и смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов.

Аmplифицируемый фрагмент идентифицировали путем электрофореза продуктов реакции в 1,5 % геле агарозы, содержащем этидиум бромид, с последующим просмотром в УФ-излучении. Для определения чувствительности метода была использована ДНК, выделенная из культуры *Campylobacter jejuni subspecies jejuni* штамма 702Т с известным содержанием м.к. (рис. 14).

Согласно результатам, отраженным на электрофореграмме, методика идентификации кампилобактерий подвида *jejuni* с использованием ПЦР является высокочувствительной. Она позволяет выявить наличие специфического фрагмента ДНК в исследуемой пробе, содержащей 10 м.к.

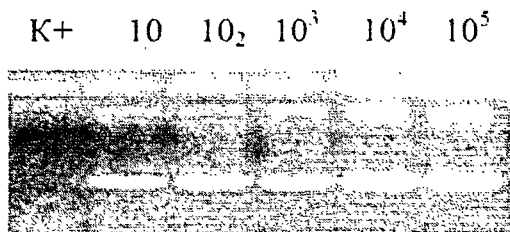


Рис. 14. Результаты изучения чувствительности ПЦР с использованием кампилобактерий подвида *jejuni*

Следующим этапом работы стала отработка оптимальных условий амплификации специфичных участков ДНК кампилобактерий с использованием физиологического раствора, коровьего молока и крови морских свинок, загрязненных культурами кампилобактерий таким образом, чтобы получить суспензии с содержанием в 1 мл 10^3 , 10^4 и 10^{10} м.к.

Полученные результаты свидетельствуют о специфичности и чувствительности разработанной ПЦР тест-системы. Наличие ДНК кампилобактерий

подвида *jejuni* было зарегистрировано только в пробах, контаминированных культурой бактерий данного вида с содержанием в пробе около 10^2 и более м.к..

При исследовании проб, контаминированных культурами кампилобактерий подвидов *fetus*, *venerealis* и *bubulus* в более высоких концентрациях (10^9 м.к.), зарегистрированы отрицательные результаты.

Комиссионное испытание тест-системы для дифференциации *C. j. s. jejuni* от бактерий других видов и родов проводили с использованием панели патологического материала, представленной 28 образцами исследуемого материала. Согласно данным электрофореграммы (рис. 15), положительные результаты были зарегистрированы при исследовании образцов (16, 28, 18) чистых культур кампилобактерий подвида *jejuni* штаммов №№ 4, 702Т и 11168; проб (7, 26, 12, 17) селезенки и печени морских свинок, инфицированных культурой штамма подвида *jejuni* № 702Т и проб (9, 27, 10) сыворотки крови крупного рогатого скота с содержанием 10^5 , 10^4 и 10^3 м.к. штамма подвида *jejuni* № 702Т.

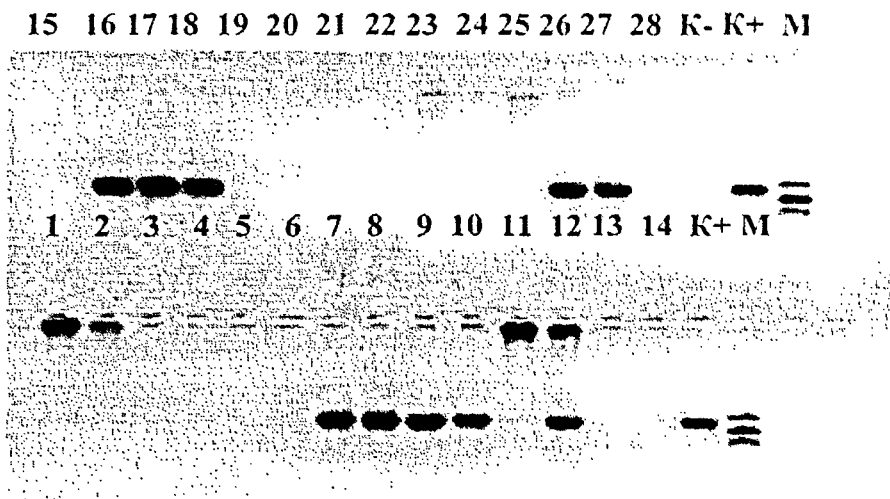


Рис. 15. Результаты изучения чувствительности и специфичности тест-системы для выявления и идентификации *C. Jejuni*

Примечание. К- – отрицательный контроль ПЦР (деионизированная вода); К+ – положительный контроль ПЦР (ДНК *C. jejuni* шт. 702Т - специфическая полоса ампликона на уровне 600 п.н.); М – маркер (набор фрагментов ДНК длиной 630 п.н., 450 п.н. и 330 п.н.).

При исследовании образцов культур кампилобактерий подвида *fetus*, *venerealis*, *bubulus*, биологического материала от животных, инфицированных культурами штаммов данных подвигов, культур бактерий рода *Salmonella* и *Yersinia*, получены отрицательные результаты.

По результатам апробации было сделано заключение о том, что ПЦР-тест-система для выявления ДНК кампилобактерий имеет высокую специфичность в рамках панели, предложенной для апробации. Тест-система имеет завершенный вид и пригодна для практического использования ветеринарными лабораториями для диагностики кампилобактериоза.

2.2.13. Сравнительное изучение разных питательных сред для культивирования кампилобактерий

Сравнительное испытание ростообеспечивающих свойств разных составов питательных сред и их компонентов провели с использованием в качестве тест-культуры штамма № 5396 типового подвида *fetus*. Суспензию культуры штамма в физиологическом растворе с содержанием около 100 м.к. в пробе (0,1 мл) высевали на плотные питательные среды в чашки Петри (таблица 7).

Из материалов таблицы видно, что удовлетворительными ростообеспечивающими свойствами, т.е. обеспечивающими рост посеянного количества м.к., обладают:

- среда на основе ферментативного гидролизата казеина (ФГК) с добавлением пептона крови; - ФГ крови с добавлением пептона; - эритрит-агар с добавлением аминокептида; - мясо-печеночный пептонный глюкозо-глицериновый агар (МППГГА); - мясо-печеночный пептонный агар с добавлением крови (МППА). Обнадеживающие результаты были получены также при испытании среды на основе смеси ФГК и КГК, содержащей в качестве ростообеспечивающей и аэротолерантной добавки комплексное хелатное соединение железа и протеинов - "Fe-комплексон".

Таблица 7

**Сравнительное изучение ростообеспечивающих свойств
питательных сред**

Основа среды	Добавки:		Среднее количество колоний
	ростообеспечивающие	аэротолерантные	
Ферментативный гидролизат казеина (ФГК)	гидролизат крови	—	16
ФГК	—	актив. уголь, FeSO ₄	0
ФГК	пептон из крови	—	100
ФГК	(гемин)	—	18
ФГ крови	пептон	—	100
Гидролизаты крови и мяса	—	—	10
ПМХА	—	—	30
Эритрит-агар	аминопептид		100
Гидролизат кильки	-	FeSO ₄ , гипосульфит, пируват и глутамат натрия	68
МППГГА	кровь	—	94
МППА	лизированная кровь	—	89
МППА	ФГК	—	76
ФКГ, КГК	-	Fe-комплексон	97
ФГК, КГК	гидролизат крови	—	82

Следует отметить, что ФГК имел низкое расщепление белка, в результате чего содержание аминокислот в нем составляло не выше 4,5 % и, в случае использования в качестве самостоятельной питательной среды, он не обеспечивал роста кампилобактерий. Тогда как в смеси с КГК, имеющим среднее расщепление белка, и содержание аминокислот в диапазоне до 6,5 %, они обеспечивали рост тест-культуры. Таким образом, ФГК в составе данной среды следует рассматривать как источник пептидов, КГК - аминокислот.

2.2.14. Определение оптимального состава питательной среды на основе гидролизатов казеина

С целью подбора оптимального состава было изготовлено 4 варианта пи-

тательной среды на основе гидролизатов казеина с добавлением Fe-комплексона. Свойства этих вариантов были изучены с использованием культур штаммов подвида *venerealis* № 43 и "Россия" (таблицы 8).

Таблица 8

**Определение оптимального состава питательной среды
на основе гидролизатов казеина**

Номер варианта и состав среды	Кол-во	Кол-во колоний штаммов	
		№ 43	"Россия"
вариант 1 1. Гидролизат казеина ферментативный сухой 2. Гидролизат казеина кислотный жидкий 3. Гидролизат крови 4. Агар 5. Вода дистиллированная	1,5 г 60 мл 15 мл 6,0 г 300 мл	89	82
вариант 2 1. Гидролизат казеина ферментативный сухой 2. Гидролизат казеина кислотный жидкий 3. Fe комплексон 4. Агар 5. Вода дистиллированная	1,5 г 60 мл 6,0 г 300 мл	79	97

С учетом полученных результатов было изготовлено еще 3 варианта питательной среды на основе гидролизатов казеина производства ВГНКИ и Института микробиологии МО РФ (г. Киров), взятых в разных соотношениях. Анализ материалов таблицы 9 показывает, что испытываемая (все варианты) и контрольная среды обеспечивают рост культур штаммов при посеве суспензий, содержащих 1000 и более м.к..

Различие в ростообеспечивающих свойствах испытываемых вариантов среды было зарегистрировано лишь при учете роста культур в последней пробирке, в которой посевная доза составляла 100 м.к.. При этом культура штамма "Россия" дала рост на всех вариантах среды и в контроле, а культура штамма № 5396 - на экспериментальной среде в 3-м варианте и в контроле.

**Результаты изучения ростообеспечивающих свойств
разных вариантов питательной среды**

Среды	Концентрация клеток в посеве						
	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2
КГК / ФГК							
1:2	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+
1:1	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
2:1	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
МПППА	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

Примечание. (+) – рост есть; (-) – отсутствие роста; (+) – сомнительный результат; в числителе – данные по штамму № 5396; в знаменателе – по штамму “Россия”.

С учетом полученных результатов, в дальнейшей работе использовали питательную среду, идентичную по составу третьему варианту и названную СПК.

2.2.15. Изучение селективных свойств СПК

Селективную способность СПК с добавлением смеси антибиотиков изучили в опыте по оценке роста культур разных штаммов кампилобактерий, культур *Yersinia enterocolitica* 09 S и 09 R, *Escherihia coli* 1330, *Salmonella enteritidis* 1654. Контролем служил мясо-пептонный печеночный полужидкий агар с добавлением 7 % аминокептида (МПППА), содержащий идентичную по составу и количеству смесь антибиотиков (таблица 10).

МПППА и СПК без добавления антибиотиков обеспечивали рост всех испытуемых культур: четырех подвидов кампилобактерий, иерсиний, сальмонелл и кишечной палочки. Однако на МПППА с антибиотиками зарегистрирован рост кампилобактерий и сальмонелл, а на СПК с антибиотиками - только кампилобактерий.

Сравнительное изучение селективных свойств испытуемых сред

Штаммы	СПК		МПША	
	с ант.	исход.	с ант.	исход.
30 (<i>fetus</i>)	+	+	+	+
32	+	+	+	+
322	+	+	+	+
5395	+	+	+	+
1980 (<i>venerealis</i>)	+	+	+	+
6829	+	+	+	+
"Россия"	+	+	+	+
702Г (<i>jejuni</i>)	+	+	+	+
53103 (<i>bubulus</i>)	+	+	+	+
"Инжир" (<i>bubulus</i>)	+	+	+	+
"ГДР" (<i>bubulus</i>)	+	+	+	+
09S <i>Y. enterocolitica</i>	-	+	-	+
09S <i>Y. enterocolitica</i>	-	+	-	+
1654 (<i>S. enteritidis</i>)	-	+	+	+
1330 (<i>E. coli</i>)	-	+	-	+

2.2.16. Изучение селективных и ростообеспечивающих свойств СПК с использованием биологического материала

Изучение ростообеспечивающих и селективных свойств СПК с селективной добавкой продолжили в опыте с использованием материала от 8 морских свинок, инфицированных кампилобактериями подвидов *fetus*, *venerealis*, *bubulus* и *jejuni*. Наличие культур кампилобактерий зарегистрировано в 7 пробах крови, 5 пробах печени и 3 пробах селезенки. При этом СПК с селективной добавкой обеспечивает рост всех четырех подвидов кампилобактерий.

Таким образом, полученные результаты подтверждают ростообеспечивающие свойства опытной питательной среды и определяют возможность ее использования в качестве селективной для выделения кампилобактерий разных видов.

2.2.17. Сравнительное изучение селективных и ростообеспечивающих свойств СПК и питательных сред фирмы "Oxoid"

Следующим этапом работы было сравнительное изучение ростообеспечивающих и селективных свойств СПК и питательных сред для кампилобактерий, выпускаемых фирмой "Oxoid" (таблица 11).

Таблица 11

Сравнительное изучение ростообеспечивающих свойств СПК и питательных сред фирмы "Oxoid"

Среда (код)	1*	2*	3*	Количество колоний (без селективных добавок)				Количество колоний (с селективными добавками)			
				5396	1123	5310	702Т	5396	1123	5310	702Т
СПК	-	-	4*	+	+	+	+	+	+	+	+
СМ 271	SR 48	SR 084E	SR 069	50	140	142	175	47	126	122	181
СМ 331	SR 48	SR 084E	SR 069	50	128	130	161	45	77	121	143
СМ 689	SR 48	SR 084E	SR 117E	30	132	121	164	28	106	123	168
СМ 739	-	-	SR 174E	11	147	118	151	10	153	90	120
СМ 935	-	-	SR 167E	23	140	111	0	21	141	117	0

Примечание: 1* - добавка для усиления роста; 2* - аэротолерантная добавка; 3* - селективная добавка; (+) - зарегистрирован рост культуры кампилобактерий на СПК (полужидкой); 4* - полимиксин В, рифампицин, ристомицин и амфотерицин В.

СПК без селективной и с селективной добавкой обеспечила рост всех используемых штаммов кампилобактерий.

Практически все среды фирмы "Oxoid" обладали хорошими ростовыми

свойствами, причем предлагаемые фирмой селективные добавки не оказывали ингибирующего действия на рост кампилобактерий. Исключение составила среда CM935, на которой, как без селективных добавок, так и с ними, не был зарегистрирован рост колоний штамма №702Т.

2.2.18. Сравнительное изучение ростообеспечивающих и селективных свойств СПК и МППА

Данные таблицы 12 показывают, что СПК и МППА без селективной добавки обеспечивали рост монокультур всех штаммов кампилобактерий и сопутствующей микрофлоры независимо от степени разведения, хотя время регистрации роста кампилобактерий зависело от посевной дозы.

На селективных СПК и МППА роста культур сопутствующей микрофлоры зарегистрировано не было.

Таблица 12

Сравнительное изучение ростообеспечивающих и селективных свойств СПК с использованием монокультур бактерий

Среда	Штамм	Время регистрации роста кампилобактерий (сутки)						
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
1	2	3	4	5	6	7	8	9
СПК полу- жидкая	<i>fetus</i>	1	2	2	3	4	4	4
	<i>venerealis</i>	1	2	2	3	4	4	4
	<i>bubulus</i>	1	2	2	2	4	4	4
	<i>jejuni</i>	1	3	4	5	-	-	-
	<i>P. vul.</i>	1	1	1	1	1	1	1
	<i>E.coli</i>	1	1	1	1	1	1	1
	<i>St. aur</i>	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Salm. enter</i>	1	1	1	1	1	1	1
СПК полу- жидкая селек- тивная	<i>fetus</i>	2	4	6	7	8	9	-
	<i>venerealis</i>	5	6	7	8	10	12	-
	<i>bubulus</i>	2	4	6	7	9	9	9
	<i>jejuni</i>	4	6	7	9	-	-	-
	<i>P. vul.</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>St. aur.</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Salm. enter</i>	-	-	-	-	-	-	-

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6	7	8	9
МПППА (контроль)	<i>fetus</i>	1	2	2	3	4	4	4
	<i>venerealis</i>	1	2	2	3	4	4	5
	<i>bubulus</i>	1	2	2	2	2	4	5
	<i>jejuni</i>	1	2	3	4	5	5	5
	<i>P. vul.</i>	1	1	1	1	1	1	1
	<i>E.coli</i>	1	1	1	1	1	1	1
	<i>St. aur</i>	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Salm. ent.</i>	1	1	1	1	1	1	1
МПППА селектив- ная (контроль)	<i>fetus</i>	8	9	-	-	-	-	-
	<i>venerealis</i>	6	7	8	9	10	12	-
	<i>bubulus</i>	2	4	6	7	9	9	10
	<i>jejuni</i>	2	3	3	4	5	6	-
	<i>P. vul.</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>St. aur</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Salm. ent.</i>	-	-	-	-	-	-	-

Примечания: (1, 2...) - сутки, на которые зарегистрирован рост культуры; (-) - отсутствие роста культуры.

Из материалов таблицы 13 видно, что при культивировании на СПК и МПППА без селективных добавок смеси кампилобактерий и культур сопутствующей микрофлоры последние подавляют рост кампилобактерий. На этих средах в течение 2-6 суток выросли только культуры кампилобактерий, практически без существенных различий во времени регистрации роста. В частности, на СПК с селективной добавкой рост кампилобактерий подвидов *fetus*, *bubulus* и *jejuni* был зарегистрирован через 3 суток, а подвида *venerealis* - через 4-5 суток, на МПППА с селективной добавкой кампилобактерии подвида *fetus* выросли на 5-6 сутки, *bubulus* и *venerealis* - на 3 сутки и *jejuni* - на 2 сутки.

Таблица 13

Результаты изучения свойств СПК с использованием смеси культур кампилобактерий и сопутствующей микрофлоры

Смесь культур	Время регистрации роста бактерий (сутки)			
	СПК	СПК сел.	МПППА	МПППА сел.
<i>fetus + St. aureus</i>	-/1	3/-	-/1	5/-
<i>fetus + E. coli</i>	-/1	3/-	-/1	6/-
<i>fetus + Pr. vulgaris</i>	-/1	3/-	-/1	6/-
<i>fetus + Salm. enter.</i>	-/1	3/-	-/1	6/-
<i>venerealis + St. ureus</i>	-/1	4/-	-/1	3/-
<i>venerealis + E. coli</i>	-/1	5/-	-/1	3/-
<i>venerealis + Pr. vulgaris</i>	-/1	5/-	-/1	3/-
<i>venerealis + Salm. enter.</i>	-/1	4/-	-/1	3/-
<i>bubulus + St. aureus</i>	-/1	3/-	-/1	3/-
<i>bubulus + E. coli</i>	-/1	3/-	-/1	3/-
<i>bubulus + Pr. vulgaris</i>	-/1	3/-	-/1	3/-
<i>bubulus + Salm. enter.</i>	-/1	3/-	-/1	3/-
<i>jejuni + St. aureus</i>	-/1	3/-	-/1	2/-
<i>jejuni + E. coli</i>	-/1	3/-	-/1	2/-
<i>jejuni + Pr. vulgaris</i>	-/1	3/-	-/1	2/-
<i>jejuni + Salm. enter.</i>	-/1	3/-	-/1	2/-

Примечания: (1, 2...) - сутки, на которые зарегистрирован рост культуры; (-) - отсутствие роста культуры; в числителе - время регистрации роста кампилобактерий, в знаменателе - сопутствующей микрофлоры.

3. ВЫВОДЫ

1. ПЦР-тест-система для диагностики бруцеллеза животных "БРУ-КОМ" обладает родовой специфичностью, что доказано наличием специфической реакции с ДНК штаммов бруцелл видов *abortus*, *melitensis*, *ovis*, *suis*, *canis*, *neotomae* и отсутствием реакции с ДНК бактерий, имеющих выраженное антигенное родство с бруцеллами.

2. ПЦР-тест-система "БРУ-КОМ" статистически достоверно превосходит ($\leq 0,05$) по чувствительности бактериологические методы при исследовании патологического материала от больных бруцеллезом животных. Диагностическая чувствительность выявления бруцелл в цельной крови и молоке крупного рога-

того скота с помощью тест-системы составляет 250 м.к./мл, в сперме барана - 1000 м.к./мл.

3. Для обеспечения максимальной диагностической эффективности тест-системы целесообразно исследовать одновременно цельную кровь, молоко, крупные лимфатические узлы и внутренние органы животных отдельно или в виде объединенных проб.

4. Применение ПЦР-тест-системы "БРУ-КОМ", с использованием праймеров *WboA* и *Eri* при параллельном тестировании патологического материала от больных бруцеллезом или иммунизированных противобруцеллезными вакцинами животных, а также культур или штаммов бруцелл разных видов позволяет исключить наличие в них штамма *B. abortus* 19.

5. Применение метода AMOS-ПЦР позволяет идентифицировать культуры всех биоваров *B. melitensis*, трех биоваров *B. abortus*, одного биовара *B. suis* и вида *B. ovis* с чувствительностью от 40 геномов бруцелл в 1 мл исследуемого образца.

6. Применение ПЦР-анализа с использованием праймеров, комплементарных нуклеотидным последовательностям участков хромосомной ДНК, фланкирующих область размером примерно 25 т.п.н., присутствующую у всех видов бруцелл кроме *B. abortus*, позволяет выявлять ДНК всех биоваров *B. abortus*.

7. ПЦР-ПДРФ-анализ позволяет идентифицировать *B. canis* и *B. neotomae* на основании полиморфизма сайтов рестрикции *BmeI8* и *HaeIII*, соответственно в генах *omp31* и *omp2b* этих видов бруцелл.

8. Вакцинные штаммы спонтанные диссоцианты *B. abortus* 82 и *B. abortus* 75/79-AB (Россия), находящиеся соответственно SR и RS-форме, в отличие от вакцинного штамма спонтанного диссоцианта *B. abortus* RB51(США), находящегося в R-форме, не содержат транспозируемой последовательности IS711 в области гена *WboA*.

9. ПЦР тест-система для диагностики кампилобактериоза "КАМ-БАК"

имеет высокую специфичность для ДНК кампилобактерий подвида *jejuni*. Аналитическая чувствительность тест-системы составляет 10 м.к./мл.

10. СПК обладает выраженными ростообеспечивающими свойствами в отношении бактерий рода *Campylobacter* подвигов *fetus*, *venerealis*, *jejuni*, *bubulus*; СПК с селективной добавкой (смесь полимиксина, ристомидина, рифампицина и амфотерицина) обеспечивает рост кампилобактерий и ингибирование роста сальмонелл, кишечной палочки, протей, стафилококков и иерсиний при исследовании разного, в том числе и биологического, материала, контаминированного или инфицированного смешанными культурами.

11. СПК с селективной добавкой сохраняет ростообеспечивающие свойства в отношении кампилобактерий и ингибирующие - в отношении сальмонелл, протей, стафилококков, эшерихий, иерсиний в течение 10 суток после изготовления при условии хранения в темном месте при температуре от 2 °С до 24 °С.

Срок наблюдения за посевами на СПК с селективной добавкой составляет не менее 12 суток.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Результаты собственных исследований настоящей диссертации использованы при разработке следующих нормативных документов:

1. Наставление по диагностике бруцеллеза животных. Утверждено Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 29 сентября 2003 г. № 13-05-02/0850;

2. Сборник санитарных СП 3.1.087-96 и Ветеринарных правил ВП 13.4.1307-96 "Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных". Кампилобактериоз. Утвержден Госсанэпиднадзором и Департаментом ветеринарии МСХ РФ (1996);

3. Методические указания по индикации возбудителя кампилобактериоза *S.jejuni* методом полимеразной цепной реакции. Утверждены Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 20 ноября 1997 г.;

4. Методические указания по диагностике бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции. Утверждены Департаментом ветеринарии Минсельхоз-

прода России 20 ноября 1997 г.;

5. Наставление по применению тест-системы «БРУ-КОМ» для диагностики бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции. Утверждено Департаментом ветеринарии МСХ РФ 26 апреля 1999 г. № 13-7-2/1580;

6. Технические условия ТУ 9388-032-00008064-96. Тест-система для диагностики бруцеллеза животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Утверждены Директором Всероссийского государственного научно-исследовательского института контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов (ВГНКИ) А.Н. Паниным 17 мая 1996 г. Согласовано с Департаментом ветеринарии 22 мая 1996 г.;

7. Наставление по применению тест-системы для диагностики и идентификации возбудителя кампилобактериоза *C. jejuni* методом полимеразной цепной реакции «КАМ-БАК». Утверждено Департаментом ветеринарии МСХ РФ 3 февраля 2004 г. № 13-5-02/0943;

8. Технические условия ТУ 9388-094-00494189-03. Тест-система для диагностики и идентификации возбудителя кампилобактериоза *C. jejuni* методом полимеразной цепной реакции «КАМ-БАК». Утверждены Заместителем директора ФГУ "ВГНКИ" Л.В. Кирилловым 8 июля 2003 г. Согласовано с Департаментом ветеринарии 3 февраля 2004 г.;

9. Временное наставление по применению среды питательной для кампилобактерий полужидкой (СПК). Утверждено Департаментом ветеринарии МСХ РФ 5 июля 2001 г.;

10. Технические условия ТУ 9388-024-00494189-01. Среда питательная для кампилобактерий полужидкая (СПК). Утверждены Директором Всероссийского государственного научно-исследовательского института контроля, стандартизации и сертификации ветпрепаратов А.Н. Паниным 4 июня 2001 г. Согласовано с Департаментом ветеринарии МСХ РФ 5 июля 2001 г.

5. СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Диагностика бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции / Складоров О.Д., Яцышина С.Б., Обухов И.Л., Мельниченко Л.П., Шумилов К.В., Шипулина О.Ю., Шипулин Г.А. // Генодиагностика инфекционных заболеваний: Сб. тез. 4-ой Всерос. науч.- практич. конф. – Москва, 2002. – С.364-366.
2. Идентификация бактерий рода бруцелла методом полимеразной цепной реакции / Шумилов К.В., Складоров О.Д., Обухов И.Л., Груздев К.Н., Шипулин Г.А., Шипулина О.Ю. // Ж. Ветеринария. - 1996. – №12. – С.19-23.
3. Изучение возможности применения полимеразной цепной реакции для диагностики латентных форм бруцеллеза у человека и животных / Яцышина С.Б., Складоров О.Д., Обухов И.Л., Шипулина О.Ю., Шипулин Г.А. // Мат. VIII Всерос. съезда эпидемиологов, микробиологов и паразитологов: Сб. статей. – М., 2002. – Т.3. - С.380–381.
4. Изучение возможности проведения прижизненной диагностики бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции / Складоров О.Д., Яцышина С.Б., Обухов И.Л., Мельниченко Л.П. // Сб. науч. тр. ВГНКИ.- М., 2003. - Т.64. – С.208-217.
5. Использование метода ПЦР для постановки окончательного диагноза на бруцеллез / Складоров О.Д., Шумилов К.В., Мельниченко Л.П., Терещенко В.В., Брюсова М.Б., Обухов И.Л. // Генодиагностика инфекционных болезней. – М. – 2004. - Т. 2. – С.239-242.
6. Использование реакции агглютинации для дифференциальной диагностики иерсиниоза и бруцеллеза / Мельниченко Л.П., Шумилов К.В., Панин А.Н., Складоров О.Д., Климанов А.И., Обухов И.Л. // Сб. науч. тр. ВГНКИ – Москва, 2001. - Т.62 - С.156-161.
7. Испытание тест-системы для диагностики бруцеллеза животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) / Шумилов К.В., Складоров О.Д., Обухов И.Л., Груздев К.Н., Панин А.Н. // Полимеразная цепная реакция в

- диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний: Мат. II Всерос. науч. – практич. конф. 20-22 января 1998 г. – М., 1998. – С.113-114.
8. Кампилобактериоз животных / Шумилов К.В., Скляр О.Д., Мельниченко Л.П., Селиверстов В.В., Яременко Н.А. // Ж. Ветеринария. – 1999. - №9. - С.6-13.
 9. Кампилобактериоз собак / Шумилов К.В., Скляр О.Д., Каравайчик А.Л., Белик В.М. // Ж. Ветеринария. – 2001. - №10. - С.46-51.
 10. Межвидовое и внутривидовое типирование бруцелл молекулярно-генетическими методами / Брюсова М.Б., Скляр О.Д., Обухов И.Л., Шумилов К.В. // Генодиагностика инфекционных болезней. – М., 2004. - Т. 2. – С. 211-213.
 11. Методические указания по диагностике бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции / Панин А.Н., Шумилов К.В., Груздев К.Н., Обухов И.Л., Скляр О.Д., Покровский В.В., Шипулин Г.А., Шипулина О.Ю. // "Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных методом полимеразной цепной реакции". – Владимир, 1998. - С. 23-28.
 12. Методические указания по индикации возбудителя кампилобактериоза *S.jejuni* методом полимеразной цепной реакции / Панин А.Н., Шумилов К.В., Груздев К.Н., Обухов И.Л., Скляр О.Д., Покровский В.В., Шипулин Г.А., Шипулина О.Ю. // "Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных методом полимеразной цепной реакции". - Владимир, 1998. - С.28-33
 13. Наставление по диагностике бруцеллеза животных. Утв. Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 29.09.03 г., №13-05-02/0850 / К.В. Шумилов, А.И. Климанов, О.Д. Скляр и др. – Москва, 2003. – 62 с.
 14. Питательная среда для кампилобактерий полужидкая (ПСК) / Скляр О.Д., Телешевская Л.Я., Шумилов К.В., Богаутдинов З.Ф., Кузнецова И.В.

- // Разработка и освоение производства нового поколения лекарственных средств для животных и их применения в ветеринарной практике: тезисы докладов Всеросс. науч. – произв. конф. – Ставрополь, 2000. – С.25-27.
15. Разработка селективной питательной среды для кампилобактерий / Складов О.Д., Телишевская Л.Я., Богаутдинов З.Ф., Пивоварова О.С. // Сб. науч. тр. ВГНКИ. - Москва, 1999. – С.94-102.
 16. Разработка тест-систем с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики бруцеллеза, кампилобактериоза животных /Складов О.Д., Мельниченко Л.П., Яцышина С.Б. и др. // Отчет о НИР (заключительный) за 1996-2000 гг. -, № ГР 01960006537. - ФГУ "ВГНКИ". - М., - 2001.06.08. - 46 с.
 17. Реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) с О-ПС антигеном ИЭВСиДВ при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота / Антонов Б.И., Шумилов К.В., Складов О.Д., Селезнев Н.А., Чурилов А.А., Воробьев В.И., Чекишев В.М. // Ж. Ветеринария. – 1994.- № 11. – С.19-22.
 18. Результаты испытаний питательной среды для выделения кампилобактеров / Складов О.Д., Телишевская Л.Я., Шумилов К.В., Богаутдинов З.Ф. // Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных. Мат. Междунар. научно-практич. конференции. - Минск: Изд-во. Тов-во "Хата", 2000. - С. 326-328.
 19. Результаты испытаний питательной среды для кампилобактерий / Складов О.Д., Телишевская Л.Я., Шумилов К.В., Богаутдинов З.Ф., Пивоварова И.К. // Сб. науч. тр. ВГНКИ. – Москва, 2001. - Т.62. - С.185-189.
 20. Селективная питательная среда для кампилобактерий / Складов О.Д., Телишевская Л.Я., Богаутдинов З.Ф., Пивоварова О.С. // Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов: Тез. Докл. Всерос. науч. конф. – Москва, 2001. – С. 78.
 21. Селекционировать штаммы *Y. enterocolitica* для изготовления иерсиниозных диагностикумов и противоиерсиниозной вакцины. Разработать мето-

- ды изготовления, стандартизации, контроля и применения препаратов для диагностики персониоза / Мельниченко Л.П., Скляров О.Д., Ниязов У.Э., Кузьмина В.Б., Комаров А.А., Вылегжанина Е.С., Астахова Т.С. // Отчет о НИР (заключительный) за 1996-2000 гг. № ГР 01960006539.- ФГУ "ВГНКИ". - М., 2001. - 65с.
22. Скляров О.Д. Бруцеллез животных в России и его специфическая профилактика / Скляров О.Д., Шумилов К.В. // Сб. науч. тр. ВГНКИ. – М., 2005. - С.182-187.
 23. Скляров О.Д. Использование полимеразной цепной реакции для выявления *S. jejuni* / Скляров О.Д., Обухов И.Л., Сорокина М.Ю. // Сборник научных трудов ВГНКИ. – М., 1999. – С.90-93.
 24. Скляров О.Д. Молекулярно-генетический метод выявления кампилобактеров в различных материалах / Скляров О.Д., Обухов И.Л., Шумилов К.В. // Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных. Мат. Междунар. научно-практич. конф. - Минск: Изд-во. Тов-во "Хата", 2000. - С. 328-330.
 25. Скляров О.Д. Прижизненная диагностика бруцеллеза животных / Скляров О.Д. // Мат. Междунар. произв. конф. "Актуальные проблемы эпизоотологии на современном этапе". – СПб., 2004. – С.116.
 26. Скляров О.Д. Результаты сравнительного изучения методов диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота / Скляров О.Д. // Сб. науч. тр. ВГНКИ. – М., 2005. - С.150-182.
 27. Скляров О.Д. Ростообеспечивающие и селективные свойства питательных сред для кампилобактеров / Скляров О.Д.// Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных. Мат. междунар. научно-практич. конф. - Минск: Изд-во тов-во "Хата", 2000. - С. 330-332.
 28. Типирование бруцелл молекулярно-генетическими методами / Брюсова М.Б., Скляров О.Д., Обухов И.Л., Давыдова Е.В., Шумилов К.В. // Сб. науч. тр. ВГНКИ. – М., 2005. - С.187-196.

29. Усовершенствование бруцеллезного антигена для кольцевой реакции с молоком / Шумилов К.В., Климанов А.И., Михайлов Н.А., Скляр О.Д. // Проблемы инфекционной патологии сельскохозяйственных животных: Тез. докл. конф., посвященной 100-летию открытия вируса ящура, 27-31 октября 1997 г. – Владимир, 1997. - С.206-207.
30. Шумилов К.В. Современный метод диагностики бруцеллеза / Шумилов К.В., Скляр О.Д. // Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных: Мат. междунар. науч.-практич. конф. 21-23 сентября 2004 г. – Воронеж, 2004. – С.461-467.
31. Экспресс-диагностика бруцеллеза методом ПЦР / Скляр О.Д., Яцышина С.Б., Шумилов К.В., Обухов И.Л., Брюсова М.Б., Мельниченко Л.П., Терещенко В.В. // Ж. Ветеринария. - 2004. – № 9. – С.18-22.

СКЛЯРОВ ОЛЕГ ДМИТРИЕВИЧ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

Подписано в печать // *с/л. с 65* Формат 60x90, 1/16.
Объем 3,0 п.л. Тираж 100 экз. Заказ № 55

Отпечатано в ООО “Фирма Блок”
107140, г. Москва, ул. Краснопрудная, вл.13. т. 264-30-73
www.blok01centre.narod.ru

Изготовление брошюр, авторефератов, печать и переплет диссертаций.