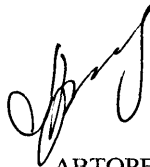


На правах рукописи

ВИКТОРОВА ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

**Полимеразная цепная реакция при диагностике
лептоспироза и изучение органотропности лептоспир у
сельскохозяйственных животных**

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



АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Москва, 2006

Работа выполнена в лаборатории качества и стандартизации лекарственных средств против зоонозных болезней Федерального государственного учреждения «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГУ ВГНКИ)» и ЗАО НПО «Нарвак»

Научный руководитель: доктор биологических наук

Забережный А.Д.

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор

Ананьина Ю.В.

Доктор ветеринарных наук, профессор

Белоусов В.И.

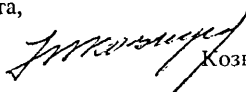
Ведущее учреждение: Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. Скрябина (МГАВМиБ)

Защита диссертации состоится "21" декабря 2006 г. в "15⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 220.011.01 в Федеральном государственном учреждении «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (Россия, 123022, Москва, Звенигородское шоссе, 5, ФГУ «ВГНКИ»)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ ВГНКИ

Автореферат диссертации разослан "20" ноября 2006 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук,
Заслуженный ветеринарный врач РФ


Козырев Ю.А.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность проблемы

Лептоспироз - инфекционная природно-очаговая болезнь животных многих видов и человека, регистрируется в большинстве стран мира.

В РФ ежегодно регистрируется от 20 до 60 неблагополучных пунктов, заболевает в среднем около 3000 животных и погибает от лептоспироза от 20 до 100 животных. Среди людей ежегодно регистрируется до 1500 тыс случаев заболевания лептоспирозом, на долю детей приходится до 20% случаев. Летальность составляет до 10% (Ананьина Ю.В., 2003; Белоусов В.И., 2003).

Лептоспирозом болеют животные различных видов в любом возрасте, наиболее тяжело болезнь протекает у молодняка. Во внешней среде лептоспиры паразитируют в природных очагах на мелких диких млекопитающих; в антропоургических – на сельскохозяйственных животных и синантропных грызунах.

Сохранение возбудителя в почках переболевших животных и длительное выделение его с мочой является одной из основных особенностей лептоспироза, обеспечивающей лептоспирам выход из организма во внешнюю среду, а, следовательно, и циркуляцию в природе.

Клинические и патологоанатомические признаки не служат достаточным основанием для постановки диагноза, необходимо лабораторное подтверждение.

Диагноз на лептоспироз подтверждают следующими методами: 1) бактериологический (включает микроскопию, выделение культуры, биопробу); 2) серологический; 3) гистологический.

Бактериологический метод в нашей стране практически не используется ввиду ряда объективных и субъективных причин, в том числе и из-за низкой чувствительности.

За рубежом и в нашей стране наиболее широко применяется серологический метод диагностики с использованием реакции микроагглютинации (РМА). РМА является чувствительным и специфичным методом, однако имеет ряд недостатков: необходимость повторного исследования сыворотки крови с целью выявления нарастания титра антител; невозможность дифференцировать вакцинированных животных от инфицированных, а также выявлять серонегативных лептоспирозоносителей.

В последнее время к традиционным микробиологическим и иммунологическим методам лабораторной диагностики инфекционных заболеваний добавились новые, основанные на использовании молекулярно-генетических технологий. Одним из таких методов является полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Преимуществами метода ПЦР как метода диагностики инфекционных болезней являются:

1. Прямое выявление возбудителей.

2. Высокая специфичность. Специфичность ПЦР была доказана исследованиями с ДНК близкородственных патогенным лептоспирам спирохет, таких как *Leptospira biflexa*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia hermsii*, *Treponema denticola*, *Treponema pallidum*, *Spirochaeta aurantia*, а также других микроорганизмов, таких как *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* и *Proteus mirabilis* (Merien F. et al., 1992; Kee SH. et al. 1994).

3. Возможность диагностики на ранних стадиях заболевания.

Многие авторы доказали возможность применения ПЦР для ранней диагностики лептоспироза (Brown P.D. et al.,1995; Kee SH. et al., 1994; Gravekamp C. et al.,1993; Merien F. et al.,1995). Полимеразная цепная реакция показала себя как эффективный диагностический метод, особенно в первые 10 суток болезни, когда клинические признаки не выражены.

4. Высокая чувствительность. Чувствительность ПЦР-анализа составляет 1-100 клеток в пробе (чувствительность иммунологических и микроскопических тестов – 1000-100000 клеток и более) (Самсонова А.П., 1996; Wagenaar J. et al., 2000).

5. Универсальность процедуры выявления различных возбудителей. Сходство химического состава всех пукленновых кислот позволяет применять унифицированные методы проведения лабораторных исследований, что дает возможность выявлять несколько возбудителей из одной биопробы.

6. Высокая скорость получения результата анализа. Унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции, автоматизация процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4-4,5 часа.

7. Возможность диагностики не только остропротекающих, но и латентных инфекций.

В качестве исследуемого материала для ПЦР могут использоваться различные биологические выделения (слизь, моча, мокрота), соскобы эпителиальных клеток, кровь, сыворотка, а также материал, получаемый из объектов внешней среды (вода, почва и т.д.). Это позволяет обнаруживать возбудителя в любых органах и тканях, что не представляется возможным при использовании бактериологических или серологических методов. Применение ПЦР является целесообразным при изучении проблем этиопатогенеза лептоспироза.

1.2. Цель работы и задачи исследований

Целью работы является создание тест-системы для диагностики лептоспироза животных методом ПЦР, изучение возможности ее использования для выявления животных-лептоспиросителей, изучение локализации и сроков персистирования лептоспир в органах и тканях животных.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Создать тест-систему ПЦР для обнаружения патогенных лептоспир.

2. Изучить специфичность тест-системы, ее способность обнаруживать ДНК лептоспир в различном патологическом материале, полученном от животных (кровь, моча, кусочки органов и тканей и т.д).

3. Провести сравнительную оценку тест-системы с традиционными методами обнаружения лептоспир.

4. Разработать нормативную документацию на тест-систему.

5. Изучить с помощью тест-системы локализацию и сроки персистенции лептоспир в органах и тканях экспериментально зараженных животных (лабораторных и сельскохозяйственных).

6. Изучить распространенность лептоспир в органах и тканях убойного крупного рогатого скота.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Обоснование применения метода полимеразной цепной реакции для диагностики лептоспироза.

2. Результаты изучения сроков обнаружения и органотропности лептоспир в организме экспериментально зараженных лабораторных и сельскохозяйственных животных.

3. Результаты изучения распространенности лептоспир в органах и тканях убойного крупного рогатого скота.

Научная новизна

Впервые в нашей стране создана тест-система для обнаружения патогенных лептоспир с помощью полимеразной цепной реакции, которая является высокочувствительной и специфичной.

Использование тест-системы позволило изучить локализацию и сроки персистенции лептоспир в органах и тканях экспериментально зараженных животных (золотистых хомячков, крупного рогатого скота и свиней), а также распространенность лептоспир в органах и тканях убойного крупного рогатого скота.

Практическая значимость работы

Разработана тест-система для обнаружения патогенных лептоспир с помощью полимеразной цепной реакции (совместно с НПО «Нарвак»).

Разработана и утверждена временная, а затем постоянная Нормативная документация:

-ТУ «Тест-система для обнаружения патогенных лептоспир методом ПЦР» 9388-001-42418073-02, утв. Департаментом ветеринарии РФ *11.07.2002 г.*

-Инструкция по применению «Тест-системы для обнаружения патогенных лептоспир методом ПЦР», утв. Департаментом ветеринарии РФ *20.03.2003 г.*

Тест-система выпускается для практического применения, используется в ветеринарных диагностических лабораториях для постановки или подтверждения диагноза на лептоспироз.

Подготовлен к согласованию в Россельхознадзоре проект «Инструкции по борьбе с лептоспирозом животных», в которой ПЦР предложена в качестве одного из методов диагностики лептоспироза.

Апробация работы

Результаты исследований по диссертационной работе доложены и положительно оценены на:

1. Всероссийской научной конференции “Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов”, посвященной 70-летию ВГНКИ, Москва, 2001 г.
2. X Московском международном ветеринарном конгрессе, Москва, 2002 г.
3. IX Всероссийской конференции по лептоспирозу, Анапа, 2003 г.
4. Межлабораторном совещании по рассмотрению диссертационной работы в ФГУ ВГНКИ, Москва, 2006 г.
5. Всероссийской научной конференции “Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов”, посвященной 75-летию ФГУ ВГНКИ, Москва, 2006 г.

Экспериментальные материалы, представленные в диссертации, получены как лично автором, так и в соавторстве с сотрудниками ИПО «Нарвак».

Публикация результатов исследований

Основные результаты работы опубликованы в 10 статьях в сборниках научных трудов ФГУ ВГНКИ, Всероссийских конференций и в научных журналах.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 115 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, практические предложения. Работа иллюстрирована 13 таблицами, 4 рисунками и 8 фотографиями и 2 приложениями. Список литературы включает 122 источника, в том числе 76 работ зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

В работе использовали 33 штамма лептоспир, а также культуры других микроорганизмов: *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Salmonella*.

Для выявления лептоспир применяли бактериологические, серологические, иммунологические и другие методы диагностики лептоспироза.

В экспериментальной работе было использовано: золотистых хомячков массой 40-50 г. – 190 гол, крупного рогатого скота – 104 гол, свиней – 27 гол, кроликов – 850 гол.

Методы.

1. Бактериологический метод.

1. Микроскопия в темном полс.

Кусочки исследуемого органа массой 2-3 г (печень, сердце, селезенка, кусочки коркового слоя почки) растирали с 5-7 см³ питательной среды или физиологического раствора до получения гомогенной взвеси. Суспензию отстаивали в холодильнике 1-2 часа и микроскопировали надосадочную жидкость при увеличении микроскопа 20 x 1,5 x 7 -10, а для более детального рассмотрения препарата 40 x 1,5 x 10. В каждой капле просматривали не менее 50 полс зрения.

Мочу исследовали непосредственно после взятия или после центрифугирования при 10000-12000 об/мин в течение 30 мин.

2. Выделение культуры лептоспир.

Для выделения культур лептоспир использовали сывороточные среды, состоящие из буферной смеси (рН 7,2-7,4), 5-7% сыворотки крови барана и витаминов В₁ и В₁₂. Посевы из патологического материала культивировали при 28-30°C до трех месяцев. Для выявления роста лептоспир через 3, 5, 7, 10 и далее каждые 5 сут культивирования проводили микроскопию содержимого из всех пробирок. Культуры лептоспир пересеивали через каждые 12-15 сут не менее чем в три пробирки. Выделенные культуры лептоспир идентифицировали с помощью лептоспирозных групповых агглютинирующих сывороток в перекрестной реакции микроагглютинации.

3. Биопроба.

Биопроба на золотистых хомячках.

Золотистых хомячков заражали внутрибрюшинно по 0,5-1,0 см³ исследуемого материала (моча, кровь, суспензии из органов). Каждую пробу вводили двум зверькам: одного убивали на 4-5 день, другого (если он не погиб) – на 14-15 день после заражения. Кровь, мочу и суспензии из органов изучали в темном поле микроскопа, делали высевы на питательные среды для культивирования лептоспир, сыворотку крови исследовали в РМА.

Биопроба на кроликах.

Кроликам вводили внутрибрюшинно суспензию из органов зараженных животных. Через 15-20 суток после введения у кроликов брали кровь и сыворотку исследовали в РМА на наличие специфических антител, наличие которых указывало на присутствие лептоспир в исследуемом материале.

II. Серологический метод.

Реакция микроагглютинации (РМА).

Для постановки реакции использовали сыворотку крови животных разных видов до и после заражения.

Исследуемую сыворотку развели 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 и далее до титра. Разведенную сыворотку при постановке РМА смешивали с антигеном в соотношении 1:1. Через 40-60 мин. контакта проводили учет реакции микроскопией каплей из каждого разведения в темном поле микроскопа при увеличении 20x7 - 10x1,5.

Титром сыворотки считали наибольшее разведение, в котором агглютинировано не менее 50% лептоспир.

III. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Для исследований методом полимеразной цепной реакции был использован набор для выявления ДНК патогенных лептоспир, разработанный совместно с ЗАО НПО «Нарвак».

Для проведения ПЦР использовали следующие режимы:

Денатурация при 94°C – 0,5 мин	} 25 циклов
Отжиг праймеров при 55°C - 0,5 мин	
Элонгация (синтез ДНК) 72°C – 0,5 мин	

Проводили две амплификации: первая – с внешней парой праймеров (LepF и LepR), вторая – с внутренней (16LNF и 16LNR). Использовали универсальные праймеры, позволяющие определять участок генома, кодирующий 16S рРНК.

Выявление продуктов реакции проводили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Гели анализировали, используя ультрафиолетовый трансиллюминатор (λ -254 нм).

Исследуемые пробы считали отрицательными, если на электрофореграммах не было четких полос или полосы не соответствовали по размеру фрагменту в контрольной пробе (т.е. располагались на другом расстоянии от старта).

IV. Изучение органотропности лептоспир.

Для изучения органотропности лептоспир животных заражали внутрибрюшинно, вводя по 0,5-1 см³ культуры хомячкам и по 150-250 см³ крупным животным (телятам, поросятам). Вскрытие хомячков проводили на 1, 2, 4, 7, 10, 15, 30, 45, 60 суток, поросят и телят – через 1, 2, 3, 6, 12 месяцев после заражения. Кровь и суспензии из органов изучали в темном поле микроскопа, делали высевы на питательные среды для культивирования лептоспир, исследовали с использованием «Тест-системы для обнаружения патогенных лептоспир методом ПЦР», сыворотку крови исследовали в РМА.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Создание тест-системы для определения патогенных лептоспир методом ПЦР

3.1.1. Определение универсальности праймеров.

Для определения универсальности праймеров брали культуры лептоспир 23 серогрупп, относящихся к виду *Leptospira interrogans*.

При постановке ПЦР со всеми штаммами длина амплификата с внешней парой праймеров составила 430 пар нуклеотидов, с внутренней парой праймеров – 180 пар нуклеотидов (таблица 1).

Полученные данные показывают, что внешние и внутренние праймеры, используемые для создания тест-системы, являются универсальными для всех лептоспир вида *Leptospira interrogans*.

Таблица 1.

Подтверждение универсальности праймеров для Leptospira interrogans

№ п/п	Серогруппа	Серовар	Штамм	Длина амплификата 1*	Длина амплификата 2**
1	Pomona	pomona	Pomona	430 п.н.	180 п.н.
2	Tarassovi	tarassovi	Perrepelicin	430 п.н.	180 п.н.
3	Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskva V	430 п.н.	180 п.н.
4	Hebdomadis	kabura	Kabura	430 п.н.	180 п.н.
5	Sejroe	polonica	493 Poland	430 п.н.	180 п.н.
6	Mini	szwajizak	Szwajizak	430 п.н.	180 п.н.
7	Canicola	canicola	Hond Utrecht IV	430 п.н.	180 п.н.
8	Icterohaemorrhagiae	copenhageni	M-20	430 п.н.	180 п.н.
9	Bataviae	djatzii	HS-26	430 п.н.	180 п.н.
10	Javanica	javanica	Veldrat Bataviae 46	430 п.н.	180 п.н.
11	Australis	erinacei europaei	Jez-1	430 п.н.	180 п.н.
12	Autumnalis	autumnalis	Akijami A	430 п.н.	180 п.н.
13	Ballum	ballum	Mus-127	430 п.н.	180 п.н.
14	Pyrogenes	pyrogenes	Salinem	430 п.н.	180 п.н.
15	Cynopteri	cynopteri	Vleermuis 3868	430 п.н.	180 п.н.
16	Celledoni	whitcoombi	Whitcoomb	430 п.н.	180 п.н.
17	Panama	panama	CZ – 214 K	430 п.н.	180 п.н.
18	Shermani	shermani	LT – 821	430 п.н.	180 п.н.
19	Djasiman	djasiman	Djasiman	430 п.н.	180 п.н.
20	Louisiana	louisiana	LSU – 1945	430 п.н.	180 п.н.
21	Sarmin	sarmin	Sarmin	430 п.н.	180 п.н.
22	Ranarum	evansi	267 – 1348	430 п.н.	180 п.н.
23	Manhao	manhao	LT – 130	430 п.н.	180 п.н.

* - длина амплификата с внешней парой праймеров

** - длина амплификата с внутренней парой праймеров

3.1.2. Оптимизация условий ПЦР.

С целью повышения чувствительности метода были проведены опыты по определению оптимального количества $MgCl_2$ в реакционной смеси. В качестве матрицы использовали ДНК штаммов лептоспир.

Проведенные эксперименты показали, что оптимальной концентрацией ионов $MgCl_2$, позволяющей амплифицировать специфический участок ДНК лептоспир,

является 1,5 мМ. При других концентрациях (0,5 мМ, 0,75 мМ, 1,0 мМ, 1,25 мМ, 2,0 мМ) либо не происходил синтез участка ДНК, либо синтезировался неспецифический, более высокомолекулярный фрагмент ДНК.

3.1.3. Определение чувствительности тест-системы.

В экспериментах использовались следующие концентрации лептоспир: 100000 кл/см³, 10000 кл/см³, 1000 кл/см³, 100 кл/см³, 10 кл/см³, 1 кл/см³, а также суспензии органов животных с добавлением заданного количества лептоспир. Чувствительность тест-системы составила: в нативных культурах лептоспир и в суспензиях органов (кроме печени) – 1-10 клеток, что соответствует примерно 40-400 клеткам/см³, в суспензии печени – 100-1000 клеток в пробе.

3.2. Оценка пригодности тест-системы ПЦР для выявления патогенных лептоспир

3.2.1. Оценка специфичности тест-системы для выявления патогенных лептоспир

Одной из поставленных нами задач было изучение специфичности тест-системы для выявления лептоспир вида *Leptospira interrogans*. Для этого были использованы штаммы патогенных лептоспир (7-10-суточные свежие; хранившиеся в ампулах при комнатной температуре и замороженные в течение 2 лет), лептоспир-сапрофитов и других микроорганизмов (эшерихии, сальмонеллы, боррелии). Кроме того, методом ПЦР исследовали органы (свежие и замороженные) золотистых хомячков, зараженных эггми штаммами лептоспир (таблица 2).

В результате проведенных исследований мы выяснили, что данная тест-система позволяет обнаруживать ДНК штаммов *Leptospira interrogans* всех исследуемых серогрупп, независимо от условий хранения. Пробы с культурами лептоспир-сапрофитов и микроорганизмов других видов были отрицательными. Также было установлено, что тест-система позволяет выявлять в патологическом материале ДНК патогенных лептоспир при исследовании образцов в любом виде (свежем или замороженном).

Таблица 2

Оценка специфичности ПЦР тест-системы
для выявления ДНК патогенных лептоспир

№ п/п	Культура	Результат с гомолог. сывор.	Результаты ПЦР с культурами, хранившимися при различных режимах			Результаты ПЦР с патог. материалом	
			Термостат (28±1°C)	-60...-70°C	Комнатная температура (18-20°C)	Свежий	Заморож. при -18...-20°C
1	Pomona ВГНКИ-6	+	+	+	+	+	+
2	Pomona Pomona	+	+	+	+	+	+
3	Icterohaemorrhagiae ВГНКИ-2	+	+	+	+	+	+
4	Icterohaemorrhagiae M-20	+	+	+	+	+	+
5	Tarassovi ВГНКИ-4	+	+	+	+	+	+
6	Tarassovi Perepelicin	+	+	+	+	+	+
7	Canicola ВГНКИ-3	+	+	+	+	+	+
8	Canicola Hond Utrecht IV	+	+	+	+	+	+
9	Grippotyphosa ВГНКИ-1	+	+	+	+	+	+
10	Grippotyphosa Moskva-V	+	+	+	+	+	+
11	Sejroe hardjo	+	+	+	+	+	+
12	Sejroe 493 Poland	+	+	+	+	+	+
13	Mini Szwajizak	+	+	+	+	+	+
14	Hebdomadis Hebdomadis	+	+	+	+	+	+
15	Hebdomadis Kabura	+	+	+	+	+	+
16	Australis Jez I	+	+	+	+	+	+
17	Autumnalis Akijami A	+	+	+	+	+	+
18	Ballum Mus-127	+	+	+	+	+	+
19	Bataviae HS-26	+	+	+	+	+	+
20	Javanica VB-46	+	+	+	+	+	+
21	Cynopteri Vleermuis 3868	+	+	+	+	+	+
22	Pyrogenes Salinem	+	+	+	+	+	+
23	Semarang Patoc I	+	-	-	-	-	-
24	Semarang Sao Paolo	+	-	-	-	-	-
25	Andamana CH-11	+	-	-	-	-	-
26	Borrelia burgdorferi	+	-	-	-	н/и	н/и
27	Escherichia coli	+	-	-	-	н/и	н/и
28	Salmonella	+	-	-	-	н/и	н/и

+ – положительный результат

-- отрицательный результат

н/и – не исследовали

3.2.2. Сравнение метода ПЦР с бактериологическим и серологическим методами

Одной из задач было сравнение созданной тест-системы с традиционными методами обнаружения лептоспир (выделение культуры, микроскопия в темном поле, биопроба на кроликах и биопроба на хомячках). Золотистых хомячков заражали внутрибрюшинно по 0,5 см³ 5-дневной культурой лептоспир серогруппы Pomona.

У хомячков, павших с клиническими признаками лептоспироза на 5-10 сутки, были следующие патологоанатомические изменения: желтушность кожи и подкожной жировой клетчатки, слизистых оболочек, легкие ярко-красного цвета, с очагами кровоизлияний; у некоторых животных в грудной и брюшной полости экссудат красного цвета, почки вишневого цвета, моча в мочевом пузыре от ярко-розового до красного цвета. При микроскопии в органах были обнаружены лептоспиры от 1-4 клеток в поле зрения в сердце до 12 клеток в поле зрения в печени. На питательных средах выделены культуры лептоспир. Выживших хомячков убивали и органы исследовали в темном поле микроскопа. При микроскопии печени, почек и сердца были обнаружены лептоспиры и выделены культуры на питательных средах.

У кроликов, которым вводили суспензии органов хомячков, через 15 суток после заражения брали кровь, сыворотку исследовали в РМА. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3

Сравнение различных методов обнаружения лептоспир в органах животных.

Органы	Методы исследования					ПЦР
	Выделение культуры	Микроскопия	Биопроба			
			на кроликах (РМА)	на хомячках		
				наличие лептоспир		
Печень	+	+	1:128000	пали	+	+
Почка	+	+	1:64000	пали	+	+
Сердце	+	+	1:128000	пали	+	+
Селезенка	-	-	1:256000	-	+	+
Легкое	-	-	1:64000	-	+	+
Мышца	-	-	1:50	-	+	+
Срок исследования	от 7 дней до 2-3 мес.	0,5-2 часа	15-20 дней	4-10 дней		4-6 часов

Наши исследования показывают, что тест-система является специфичной, высокочувствительной. По скорости получения результатов ПЦР уступает лишь микроскопии, однако значительно превосходит данный метод по чувствительности.

3.2.3. Обнаружение лептоспир в патологическом материале

Одной из задач исследований было изучение сроков обнаружения лептоспир в органах и тканях инфицированных животных. Тест-систему ПЦР использовали для обнаружения лептоспир в органах и тканях золотистых хомячков в первые-вторые

сутки после заражения. Для заражения хомячков использовали штаммы лептоспир 15 серогрупп. На первые, вторые сутки после заражения зверьков вскрывали и их органы исследовали с помощью тест-системы. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4

Результаты исследования органов инфицированных золотистых хомячков с помощью тест-системы для выявления патогенных лептоспир методом ПЦР

Заражающий штамм	Органы / день							
	печень		почка		сердце		селезенка	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Icterohaemorrhagiae M-20	+	+	+	+	+	+	+	+
Canicola Hond Utrecht IV	+	+	+	+	+	+	+	+
Grippytyphosa Moskva	+	+	+	+	+	+	+	+
Pomona Pomona	+	+	+	+	+	+	+	+
Tarassovi Perepelicin	+	+	-	+	+	+	+	+
Sejroe 493 Poland	+	+	+	+	+	+	+	+
Hebdomadis Kabura	-	+	+	+	+	-	-	-
Mini Szwajizak	+	+	+	+	+	+	+	+
Australis Jez 1	+	+	-	+	-	+	+	+
Autumnalis Akijami A	+	+	+	+	+	+	+	+
Ballum Mus 127	-	-	-	-	-	-	-	-
Bataviae HS-26	-	-	-	-	-	-	-	+
Cynopteri Vleermuis 3868	+	+	+	+	-	+	+	+
Javanica VB-46	-	+	-	-	+	+	+	+
Pyrogenes Salinem	+	+	+	+	+	+	-	-
Контроль	-	-	-	-	-	-	-	-

Тест-система ПЦР позволяет обнаруживать лептоспиры в органах зараженных животных уже в первые двое суток после заражения, т.е. до появления каких-либо клинических признаков болезни. Полученные результаты были подтверждены одним или несколькими из традиционных методов. При исследовании органов от неинфицированных хомячков получены отрицательные результаты.

Приведенные данные показывают возможность использования тест-системы ПЦР для обнаружения лептоспир в органах животных в первые сутки после заражения.

3.2.4. Сравнение различных методов диагностики лептоспироза при исследовании крови и мочи инфицированных животных

Опыты были поставлены на инфицированных лептоспирами телятах и поросятах. Животных заражали культурами лептоспир внутривентриально. Для исследования использовали мочу и кровь зараженных животных, взятые в различные сроки после заражения. Результаты исследования крови животных представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5.

*Результаты исследования крови
инфицированных лептоспирами телят.*

Срок после заражения	Метод исследования / заражающий штамм лептоспир серогруппы								
	выделение культуры			РМА			ПЦР		
	Canicola	Ictero-haemorrhagiae	Pomona	Canicola	Ictero-haemorrhagiae	Pomona	Canicola	Ictero-haemorrhagiae	Pomona
До опыта	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 сут	+	-	-	-	-	-	+	+	+
7 сут	-	-	+	1:2000	-	-	+	+	+
14 сут	-	+	-	1:8000	-	-	+	+	+
21 сут	-	-	-	1:16000	-	1:100	+	+	+
1 мес	-	-	-	1:64000	1:500	1:500	+	+	+
1.5 мес	-	-	-	1:64000	1:500	1:500	-	-	-
2 мес	-	-	-	1:32000	1:500	1:100	-	-	-

Таблица 6.

*Результаты исследования крови
инфицированных лептоспирами поросят*

Срок после заражения	Метод исследования / заражающий штамм лептоспир серогруппы											
	выделение культуры				РМА				ПЦР			
	Canicola	Aus-tralis	Ictero-haemorrhagiae	Pomona	Canicola	Aus-tralis	Ictero-haemorrhagiae	Pomona	Canicola	Aus-tralis	Ictero-haemorrhagiae	Pomona
До опыта	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 сут	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
7 сут	+	-	+	-	1:400	1:100	1:100	1:50	+	+	+	+
14 сут	+	+	-	+	1:800	1:200	1:200	1:200	+	+	+	+
21 сут	-	-	-	-	1:4000	1:500	1:800	1:1600	+	+	+	+
1 мес	-	-	-	-	1:8000	1:800	1:4000	1:8000	+	+	+	+
1.5 мес	-	-	-	-	1:2000	1:800	1:3200	1:8000	-	-	-	-
2 мес	-	-	-	-	1:2000	1:400	1:2000	1:4000	-	-	-	-

Как видно из таблиц, первые антитела в сыворотке крови животных в РМА выявлялись на 7-30 сутки у телят и на 7 сутки у поросят. Титры антител нарастают до 1 месяца после заражения, после чего непродолжительное время сохранялись на определенном уровне и начинали снижаться. При использовании тест-системы для выявления патогенных лептоспир методом ПЦР лептоспиры в крови обнаруживались с 3 сутки до 1 месяца после заражения у всех животных.

При исследовании мочи от зараженных телят в темном поле микроскопа лептоспиры обнаружены только в трех пробах из 372 (0,8%): на 12 сутки у теленка, зараженного лептоспирами серогруппы Canicola и на 14 – у телят, зараженных лептоспирами серогрупп Canicola и Icterohaemorrhagiae. При исследовании тех же проб с помощью ПЦР – в 283 пробах (76,07%), начиная с 5-10 дня и в течение 6 месяцев после заражения у всех животных.

При исследовании мочи инфицированных поросят методом микроскопии лептоспиры обнаружены в 94 пробах из 553 (17%) на 10-20 день и выявлялись до 3

месяцев после заражения, методом ПЦР – в 388 пробах (70,16%), начиная с 4-7 дня и до 6 месяцев после заражения. Выделить культуру лептоспир из мочи не удалось ни от одного из животных.

Из приведенных результатов можно заключить, что тест-система ПЦР является специфичной, высокочувствительной и может быть использована для ранней диагностики лептоспироза, а также для выявления лептоспиросителей.

3.3. Оценка методов диагностики при исследовании вакцинированных и инфицированных животных

Нами проведено сравнение показателей РМА и ПЦР у вакцинированных и инфицированных хомячков. С этой целью животных разделили на две группы. Зараженные животных одной группы проводили внутрибрюшинно культурой лептоспир серогруппы *Canicola*. Зверькам второй группы вводили подкожно вакцину против лептоспироза. В различные сроки после заражения/вакцинации проводили убой хомячков и исследовали сыворотку крови в РМА. Внутренние органы и ткани (сердце, печень, почки, легкие, селезенка, семенники/яичники, спинной мозг, кровь и моча, лимфатические узлы) каждого хомячка исследовали методом ПЦР, микроскопией в темном поле, делали посев на питательные среды для культивирования лептоспир. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7

Сравнительная оценка показателей РМА и ПЦР у вакцинированных и инфицированных хомячков

Метод исследования	Количество положительных результатов/общее количество											
	Вакцинированные (на сутки после вакцинации)						Инфицированные (на сутки после заражения)					
	1	2	7	15	30	60	1	2	7	15	30	60
Микроскопия	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	1/3	1/3	0/3
Выделение культуры	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	0/3
ПЦР	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
РМА(титр)	-	1:5	1:10-1:20	1:100	1:200-1:400	1:100-1:200	-	1:5	1:10-1:20	1:50	1:200-1:400	1:100-1:200

Титр аггител в РМА у вакцинированных и инфицированных животных был практически одинаков и составлял 1:200 – 1:400 через 30 суток после заражения/вакцинации. Микроскопией и культивированием лептоспиры обнаруживали у зараженных животных не во всех случаях. В органах (сердце, печень) инфицированных животных методом ПЦР лептоспиры были обнаружены на 1-15 сутки после заражения во всех органах и тканях, на 60 сутки – в почках, моче, спинном мозге и лимфатических узлах. В органах и тканях вакцинированных животных лептоспиры обнаружены не были.

Таким образом, наши исследования показывают, что тест-система ПЦР позволяет дифференцировать вакцинированных животных от инфицированных.

3.4. Изучение органотропности лептоспир

По данным литературы лептоспиры локализуются не только в почках животных-лептоспириноносителей, но и в генитальном тракте (матке, яичниках, яйцеводах), в легких, печени, селезенке, сердце, мышечной ткани, в мозговой ткани. Одной из наших задач было изучение расселения лептоспир в органах и тканях животных и сроков их персистенции.

3.4.1. Изучение органотропности лептоспир в организме золотистых хомячков

Для изучения расселения лептоспир в организме лабораторных животных нами исследованы органы и ткани хомячков через 1, 2, 4, 7, 10, 15, 30, 45, 60 суток после заражения. Наряду с методом ПЦР использовали и традиционные методы выявления лептоспир (микроскопия в темном поле, выделение культуры и биопроба). Результаты исследований показаны в таблице 8.

Как видно из данных таблицы, уже через сутки после заражения ДНК лептоспир обнаруживается у большинства исследованных хомячков во всех органах и тканях, а на 4-15 сутки – у всех исследованных животных во всех исследованных биологических образцах. Через месяц после заражения лептоспиры исчезают из легких и крови лабораторных животных, а через 2 месяца они обнаруживаются только в почках и моче, спинном мозге и лимфоузлах.

В течение первых семи суток после заражения лептоспиры традиционными бактериологическими методами обнаружены в 100% случаев, в последующие сроки вероятность их обнаружения снизилась до 50%, а через 2 месяца после заражения микроскопией и посевом на питательные среды лептоспиры обнаружены не были. Наибольшая вероятность (до 90%) обнаружения лептоспир в органах и тканях зараженных животных наблюдалась при использовании метода биопробы на кроликах.

Таблица 8

*Обнаружение ДНК лептоспир в органах хомячков
в различные сроки после заражения*

Органы	Обнаружение ДНК лептоспир в органах через суток после заражения (количество положительных/количество исследованных)								
	1	2	4	7	10	15	30	45	60
Печень	11/15	12/15	15/15	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3
Почка	12/15	14/15	15/15	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Легкое	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3
Селезенка	14/15	15/15	15/15	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
Сердце	11/15	15/15	15/15	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3
Спинальный мозг	1/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Семенники (яичники)	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
Мышцы	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
Моча	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Лимфоузлы	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Кровь	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3

3.4.2. Изучение органотропности лептоспир у крупного рогатого скота

Для изучения расселения лептоспир в организме сельскохозяйственных животных нами исследованы органы и ткани телят – через 1, 2, 3, 6 и 12 месяцев после заражения. Наряду с методом ПЦР использовали и традиционные методы обнаружения лептоспир (микроскопия в темном поле, выделение культуры и биопроба).

Телят массой 80-100 кг (18 гол.) заражали внутрибрюшинно 5-7-дневными культурами лептоспир серогрупп *Ромона*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola* в дозе 20-50 млн лептоспир. Убой животных и отбор органов проводили через 1, 2, 3, 6 и 12 месяцев после заражения.

Кратковременное незначительное (на 0,5-1,0⁰С) повышение температуры было отмечено у 3 из 10 телят на 5-7 сутки после заражения. Гемоглобинурия наблюдалась у 6 животных на 8-14 сутки после заражения.

Результаты исследования органов телят на наличие лептоспир представлены в таблице 9 и на фото 1-4.

Таблица 9

Результаты исследования органов инфицированных телят на наличие лептоспир

Органы	Срок заражения после	ПЦР	Микроскопия	Выделение культуры	РМА (титр антител в сыворотке кроликов)
1	2	3	4	5	6
Печень	1 мес	+	-	-	1:50
	2 мес	+	-	-	1:50-1:100
	3 мес	-	-	-	-
	6 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль		-	-	-	-
Почки	1 мес	+	+	+	1:50
	2 мес	+	+	+	1:50-1:100
	3 мес	+	+	-	1:50-1:200
	6 мес	+	-	-	1:100
	9 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль		-	-	-	-
Селезенка	1 мес	+	-	-	1:100
	2 мес	+	-	-	1:100
	3 мес	+	-	-	1:100
	6 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль	1 – 12 мес.	-	-	-	-
Сердце, легкие	1 мес	+	-	-	1:50-1:100
	2 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль	1 – 12 мес.	-	-	-	-
Семенники / яичники	1 мес	+	+	-	1:50-1:100
	2 мес	+	-	-	1:50-1:100
	3 мес	+	-	-	1:50-1:100
	6 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль		-	-	-	-

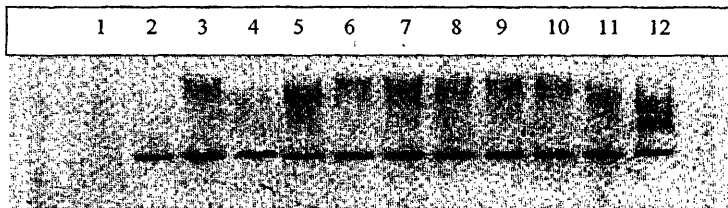
Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6
Спинальный мозг	1 мес	+	-	-	1:50-1:100
	2 мес	+	+	-	1:100
	3 мес	+	-	-	1:100
	6 мес	+	-	-	1:50
	9 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль		-	-	-	-
Мышцы	1 мес	+	-	-	1:50
	2 мес	+	-	-	1:50
	3 мес	+	-	-	1:50
	6 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль		-	-	-	-
Лимфоузлы	1 мес	+	-	-	1:50-1:100
	2 мес	+	-	-	1:100
	3 мес	+	-	-	1:50-1:100
	6 мес	+	-	-	1:50-1:200
	9 мес	+	-	-	1:200
	12 мес	+	-	-	1:50
Контроль		-	-	-	-

При использовании тест-системы ПЦР лептоспиры обнаруживали в течение месяца во всех органах и тканях телят. Через 2 месяца после заражения лептоспиры не выявлены в крови, сердце и легких, через 3 месяца – в печени. Через полгода после заражения лептоспиры обнаруживали только в почках, моче, спинном мозге и лимфоузлах. В лимфатических узлах зараженных телят ДНК лептоспир выявляли на протяжении всего срока исследования (12 месяцев).

В качестве контроля при постановке ПЦР использовали неинфицированных животных. Все пробы от них были отрицательными.

Фото № 1. Результаты исследования проб органов телят через 1 месяц после заражения



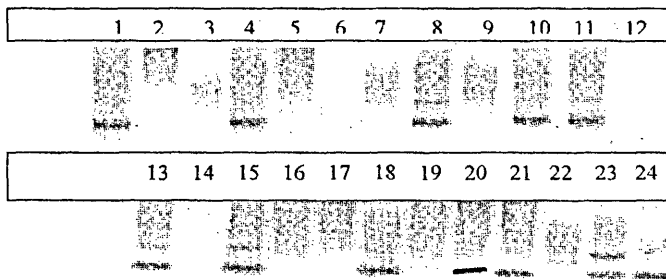
1 – отрицательный контроль, 2 – почки, 3 – селезенка, 4 – спинной мозг, 5 – лимфоузлы, 6 – сердце, 7 – семенники, 8 – мышцы, 9 – легкие, 10 – моча, 11 – печень, 12 – положительный контроль.

Фото № 2. Результаты исследования проб органов телят через 2 месяца после заражения



1 – печень, 2 – почки, 3 – селезенка, 4 – спинной мозг, 5 – лимфоузлы, 6 – сердце, 7 – семенники, 8 – мышцы, 9 – легкие, 10 – моча, 11 – отрицательный контроль, 12 – положительный контроль.

Фото № 3. Результаты исследования органов телят методом ПЦР через 3 и 6 месяцев после заражения.



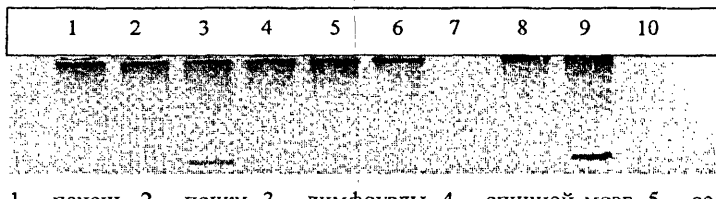
Верхний ряд – через 6 месяцев после заражения.

1 – положительный контроль, 2 – печень, 3 – сердце, 4 – почки, 5 – селезенка, 6 – легкие, 7 – семенники, 8 – спинной мозг, 9 – мышцы, 10 – лимфоузлы, 11 – моча, 12 – отрицательный контроль.

Нижний ряд – через 3 месяца после заражения.

13 – положительный контроль, 14 – отрицательный контроль, 15 – почки, 16 – сердце, 17 – легкие, 18 – селезенка, 19 – печень, 20 – мышцы, 21 – семенники, 22 – кровь, 23 – спинной мозг, 24 – лимфоузлы.

Фото № 4. Результаты исследования органов телят методом ПЦР через 12 месяцев после заражения.



1 – печень, 2 – почки, 3 – лимфоузлы, 4 – спинной мозг, 5 – селезенка, 6 – сердце, 7 – семенники, 8 – мышцы, 9 – положительный контроль, 10 – отрицательный контроль.

3.4.3. Изучение органотропности лептоспир у свиней

Для изучения расселения лептоспир в организме животных нами исследованы органы и ткани поросят – через 1, 2, 3 недели и через 1, 2, 3, 6, 12, 14 месяцев после заражения. Наряду с методом ПЦР использовали традиционные методы выявления лептоспир (микроскопия в темном поле, выделение культуры и биопроба).

Поросят массой 20-30 кг (18 гол.) заражали внутрибрюшинно культурами лептоспир в дозе 15-50 млн клеток. Проводили ежедневную термометрию. Незначительное кратковременное повышение температуры (на 0,5-1,0⁰С) отмечено у 4 из 18 поросят на 5-7 сутки после заражения. Гемоглинурия продолжительностью не более двух суток наблюдалась на 8-10 сутки после заражения у 5 животных.

Результаты исследования органов и тканей от инфицированных поросят в различные сроки после заражения представлены в таблице 10 и фото 5-8.

Таблица 10.

Обнаружение лептоспир в органах поросят в различные сроки после заражения

Органы	Срок после заражения	ПЦР	Микроскопия	Выделение культуры	РМА (титр антител в сыворотке кроликов)
1	2	3	4	5	6
Печень	1 неделя – 1 мес	+	-	-	1:50-1:100
	2 мес	+	-	-	1:100
	3 мес	+	-	-	1:100
	6 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль		-	-	-	-
Почки, моча	1 неделя – 1 мес	+	+	+	1:50
	2 мес	+	+	+	1:200
	3 мес	+	+	-	1:100
	6 мес	+	-	-	-
	9 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль		-	-	-	-
Селезенка	1 неделя – 1 мес	+	-	-	1:100-1:400
	2 мес	+	-	-	1:400
	3 мес	+	-	-	1:200

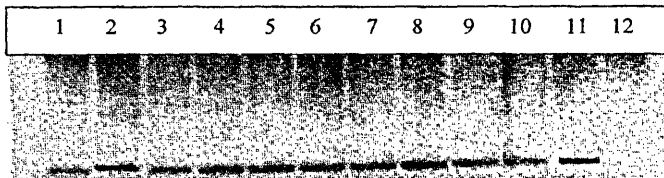
Продолжение таблицы 10

1	2	3	4	5	6
Селезенка	6 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль		-	-	-	-
Сердце, легкие	1 неделя – 1 мес	+	-	-	1:50
	2 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль	1 – 12 мес.	-	-	-	-
Семенники /яичники	1 неделя – 1 мес	+	+	-	1:50-1:100
	2 мес	+	-	-	1:100
	3 мес	+	-	-	1:50
	6 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль		-	-	-	-
Спинальный мозг	1 неделя – 1 мес	+	-	-	1:50-1:100
	2 мес	+	+	-	1:200
	3 мес	+	-	-	1:100
	6 мес	+	-	-	-
	9 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль		-	-	-	-
Мышцы	1 мес	+	-	-	1:50
	2 мес	+	-	-	1:50
	3 мес	+	-	-	1:50
	6 – 12 мес	-	-	-	-
Контроль		-	-	-	-
Лимфоузлы	1 неделя – 1 мес	+	-	-	1:50-1:100
	2 мес	+	-	-	1:100
	3 мес	+	-	-	1:50
	6 мес	+	-	-	1:50
	9 мес	+	-	-	1:50
	12-14 мес	+	-	-	-
Контроль		-	-	-	-

Приведенные в таблице данные показывают, что лептоспиры через 1 неделю и до 1 месяца после заражения обнаруживаются методом ПЦР во всех органах и тканях зараженных поросят, кроме крови. Через 2 месяца после заражения лептоспиры исчезают из сердца, легких. Через полгода после заражения ДНК лептоспир обнаруживается только в почках, моче, спинном мозге и лимфоузлах. В лимфоузлах зараженных поросят ДНК лептоспир обнаруживали на протяжении всего срока исследования (14 месяцев). В органах контрольных неинфицированных животных лептоспиры обнаружены не были ни одним из методов.

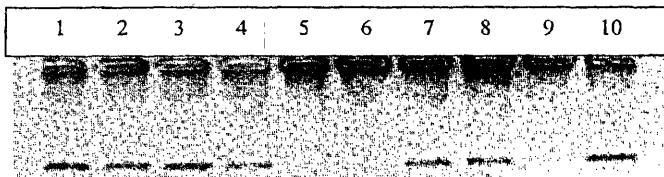
Традиционными бактериологическими методами лептоспиры обнаружены до 3 месяцев после заражения в почках и моче животных, в остальных органах – единичные случаи обнаружения лептоспир. Достоверность полученных с помощью метода ПЦР результатов подтверждена наличием аггел в сыворотках крови кроликов, зараженных суспензией органов от поросят, отрицательными результатами исследований проб от контрольных животных и специфичностью тест-системы ПЦР при постановке предыдущих опытов.

Фото № 5. Результаты исследований органов поросенка
через 1 месяц после заражения



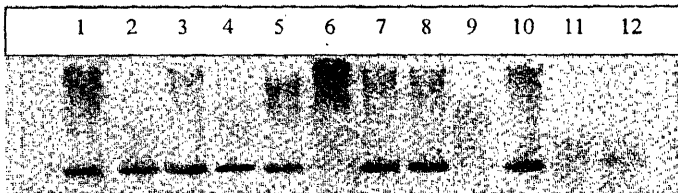
1 – положительный контроль, 2 – почки, 3 – селезенка, 4 – спинной мозг, 5 – лимфоузлы, 6 – сердце, 7 – семенники, 8 – мышцы, 9 – печень, 10 – моча, 11 – легкие, 12 – отрицательный контроль.

Фото № 6. Результаты исследований органов поросенка
через 2 месяца после заражения



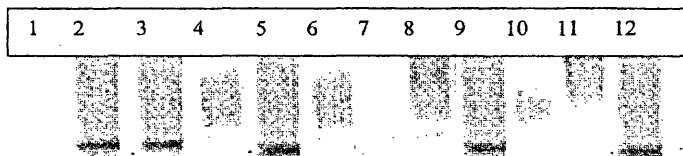
1 – почки, 2 – селезенка, 3 – спинной мозг, 4 – печень, 5 – сердце, 6 – легкие, 7 – семенники, 8 – лимфоузлы, 9 – отрицательный контроль, 10 – положительный контроль.

Фото № 7. Результаты исследований органов поросенка
через 3 месяца после заражения



1 – положительный контроль, 2 – почки, 3 – селезенка, 4 – спинной мозг, 5 – лимфоузлы, 6 – сердце, 7 – семенники, 8 – печень, 9 – легкие, 10 – моча, 11 – кровь, 12 – отрицательный контроль.

Фото № 8. Результаты исследований органов поросенка через 6 месяцев после заражения



1 – отрицательный контроль, 2 – положительный контроль, 3 – почки, 4 – селезенка, 5 – спинной мозг, 6 – сердце, 7 – семенники, 8 – мышцы, 9 – лимфоузлы, 10 – печень, 11 – легкие, 12 – моча.

3.4.4. Изучение распространенности лептоспир в органах убойного крупного рогатого скота

Одной из задач наших исследований было изучение распространенности лептоспир у крупного рогатого скота, поступающего на убой.

Отбор проб разных органов проводили на Таганском мясокомбинате. Животные поступали на убой из благополучных по лептоспирозу хозяйств Костромской, Владимирской и Волгоградской областей. Пробы отбирали в одноразовую посуду стерильным одноразовым инструментом, что исключало возможность контаминации проб.

При исследовании образцов, взятых от 80 голов крупного рогатого скота, поступающего на убой, были получены следующие результаты (таблица 11). При осмотре туш у двух была обнаружена желтушность подкожной жировой клетчатки, у 7 – кровоизлияния под почечной капсулой, у 2 – кровоизлияния на поверхности печени и у 12 – пневмонии.

Антитела в сыворотке крови в РМА в титре 1:50 к лептоспирам 1-2 серогрупп выявлены у 35 животных (43,75%), в титре 1:100 – у 8 (10,0%), 1:200 – у 3 животных (3,75%). У 34 животных (42,5%) антитела не выявлены.

При исследовании методом ПЦР органов от животных ДНК лептоспир обнаружена только в лимфатических узлах у 26 животных (32,5%), из них с титром антител в сыворотке крови 1:50 – 12 положительных проб (15,0%), с титром 1:100 – 5 (6,25%), с титром 1:200 – 3 (3,75%), с отрицательным результатом РМА – 6 проб (7,5%). У животных, имеющих титр антител 1:200, ДНК лептоспир обнаружена в 100% случаев, 1:100 – в 62,5%, 1:50 – в 46,15%, у животных, не имеющих антител,

– в 35,29%. У животных, имеющих патологоанатомические изменения (28,75%), не обнаружены ни антитела, ни ДНК лептоспир.

Таблица 11

Результаты исследования убойного крупного рогатого скота на наличие лептоспир

Титр антител к лептоспирам в сыворотке крови	Кол-во животных	% от общего числа	Положительный результат при исследовании в ПЦР	
			Кол-во	% от общего числа
0	34	42,5	6	7,5
1:50	35	43,75	12	15,0
1:100	8	10,0	5	6,25
1:200	3	3,75	3	3,75
ИТОГО	80		26	32,5

Наличие ДНК лептоспир в лимфатических узлах исследованных животных, по-видимому, указывает на инфицированность этих животных в прошлом. По нашему мнению, обнаружение ДНК лептоспир в лимфатических узлах не даст основания считать их лептоспиросителями в связи с отсутствием лептоспир в других органах и тканях и невозможностью выхода их из лимфоузлов, что предотвращает возможность контаминации лептоспирами окружающей среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы была создана тест-система на основе ПЦР, изучены ее специфичность и чувствительность, с помощью созданной тест-системы изучены локализация и сроки персистенции лептоспир в органах животных.

Проведенные опыты показали, что тест-система является специфичной при обнаружении патогенных лептоспир в любом материале: в культурах лептоспир, свежих и хранившихся запаятыми в амулах при комнатной температуре и замороженных при минус 70°C, а также при исследовании свежих и хранившихся в замороженном состоянии органов хомячков.

Проведено сравнение ПЦР с классическими методами диагностики лептоспироза, такими как микроскопия в темном поле, выделение культуры, биопроба, РМА. Сравнение этих методов в экспериментах на золотистых хомячках показало, что ПЦР является специфичным, высокочувствительным и быстрым по постановке методом.

Диагностическая значимость метода ПЦР при лептоспирозе была исследована в экспериментах на золотистых хомячках, зараженных лептоспирами 15 серогрупп, а также при исследовании крови и мочи телят и поросят, инфицированных лептоспирами. В органах золотистых хомячков патогенные лептоспиры обнаруживались

на 1-2 сутки после заражения, в органах телят и поросят – на 3 сутки после инфицирования.

При исследовании проб мочи от поросят и телят не удалось выделить ни одной культуры лептоспир, а при микроскопии положительные результаты получены в моче телят в 0,8% случаев, при исследовании с помощью тест-системы ПЦР – 76,07%; в моче поросят при микроскопии – 17%, при использовании ПЦР – 71,73%.

Метод ПЦР был использован нами для дифференциации вакцинированных животных от инфицированных. В пробах, полученных от инфицированных животных, ДНК лептоспир обнаруживалась во всех органах и тканях, в то время как у вакцинированных животных лептоспиры не выявлялись. При этом титры антител в сыворотке крови были практически одинаковыми у инфицированных и вакцинированных животных. Полученные нами данные позволяют сделать вывод, что ПЦР дает возможность дифференцировать инфицированных животных от животных, имеющих в сыворотке крови поствакцинальные антитела.

Наши исследования по локализации и срокам персистенции лептоспир в органах и тканях лабораторных животных показали, что методом ПЦР лептоспиры через сутки после заражения обнаруживаются у большинства исследованных хомячков во всех органах и тканях, а на 4-15 сутки – у всех животных во всех органах и тканях. Через месяц после заражения лептоспиры исчезают из легких и крови, а через 2 месяца (срок исследования) они обнаруживаются только в почках и моче, спинном мозге и лимфоузлах лабораторных животных.

Исследование локализации и сроков персистенции лептоспир в организме сельскохозяйственных животных (телят и поросят) показало, что методом ПЦР лептоспиры обнаруживаются через 1 месяц во всех органах и тканях телят. Через 2 месяца после заражения лептоспиры не выявлены в крови, сердце и легких, через 3 месяца – в печени. Через полгода после заражения лептоспиры обнаружены только в почках, моче, спинном мозге и лимфоузлах. В лимфатических узлах зараженных животных ДНК лептоспир обнаруживали на протяжении всего срока исследования (12 месяцев у телят и 14 месяцев у поросят).

При исследовании проб, взятых от 80 голов убойного крупного рогатого скота антитела в сыворотке крови в РМА выявлены у 57,5% животных. При исследовании методом ПЦР ДНК лептоспир обнаружена только в лимфатических узлах у 32,5% животных. Наличие ДНК лептоспир в лимфатических узлах указывает на инфицирование этих животных в прошлом.

Представленные результаты позволяют сделать вывод, что тест-систему для выявления патогенных лептоспир методом ПЦР можно использовать для ранней

диагностики лептоспироза животных, наряду с классическими методами исследования. Это высокочувствительный и специфичный метод диагностики. Существенным преимуществом данного метода является возможность дифференциации вакцинированных и инфицированных животных, а также выявление лептоспиросителей.

Данную тест-систему можно использовать также для изучения органотропности лептоспир у животных и, кроме этого, для контроля эффективности противолептоспирозных препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Создана тест-система и оптимизированы условия для выявления патогенных лептоспир методом ПЦР, определены ее специфичность и чувствительность, которая составляла в нативных культурах и суспензиях органов – 1-10 клеток в пробе, что соответствует примерно 40-400 клеткам/см³, в печени – 100-1000 клеток в пробе.

2. Сравнение различных методов диагностики показало, что полимеразная цепная реакция (ПЦР) может быть использована для диагностики лептоспироза животных наравне с традиционными методами исследований (бактериологическими и серологическими).

3. «Тест-система для обнаружения патогенных лептоспир методом ПЦР» позволяет поставить диагноз на лептоспироз в течение 4-6 часов.

4. Тест-система ПЦР обеспечивает выявление лептоспир не только в нативном, но и в замороженном патологическом материале.

5. ДНК лептоспир обнаруживается в крови, моче и органах животных на 1-4 сутки после заражения, что позволяет диагностировать лептоспироз на ранних стадиях болезни.

6. Полимеразная цепная реакция позволяет дифференцировать вакцинированных животных от инфицированных лептоспирами.

7. У лабораторных животных методом ПЦР лептоспиры обнаружены в большинстве паренхиматозных органов через сутки после заражения, а на 2-15 сутки – во всех органах и тканях. Через 2 месяца они выявлены только в почках, моче, спинном мозге и лимфатических узлах инфицированных животных.

8. У сельскохозяйственных животных после заражения лептоспиры проникают в кровь в течение первых 3-4 суток и разносятся по всем органам и тканям, а затем постепенно элиминируются в течение 3-6 месяцев. В лимфатических узлах

ДНК лептоспир обнаруживалась в течение всего срока исследований (12 месяцев у телят и 14 месяцев у поросят).

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для диагностики лептоспироза, наряду с традиционными методами исследований, рекомендуем использовать «Тест-систему для обнаружения патогенных лептоспир методом ПЦР».

2. Для прижизненной диагностики лептоспироза целесообразно использовать мочу, кровь, спинномозговую жидкость; для посмертной диагностики можно использовать любые паренхиматозные органы.

3.: «Тест-систему для обнаружения патогенных лептоспир методом ПЦР» следует использовать:

- для ранней диагностики лептоспироза;
- для выявления лептоспиросителей;
- для дифференциации инфицированных и вакцинированных животных;
- для оценки эффективности противолептоспирозных препаратов.

4. Разработана и утверждена в установленном порядке нормативная документация:

- ТУ 9388-001-42418073-02 «Тест-система для обнаружения патогенных лептоспир методом ПЦР», утв. Департаментом ветеринарии МСХ РФ *11.07.02 г.*;
- Наставление по применению «Тест-системы для обнаружения патогенных лептоспир методом ПЦР», утв. Департаментом ветеринарии МСХ РФ *20.03.03 г.*

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Викторова Е.В., Гребенникова Т.В. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) при диагностике лептоспироза. / Тезисы докладов Всероссийской научной конференции “Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов”. - Москва, ВГНКИ. -- 14-15 февраля 2001 г. - с. 46.
2. Малахов Ю.А., Соболева Г.Л., Лебедев О.А., Сурмило А.П., Викторова Е.В. Оценка методов лабораторной диагностики и специфической профилактики лептоспироза собак / Тезисы докладов IX Московского международного ветеринарного конгресса – 12-14 апреля 2001 г.
3. Викторова Е.В., Гребенникова Т.В., Соболева Г.Л., Малахов Ю.А. Возможности полимеразной цепной реакции (ПЦР) при диагностике лептоспироза / Тезисы докладов X Московского международного ветеринарного конгресса – 11-13 апреля 2002 – с. 94
4. Викторова Е.В. Выявление локализации лептоспир в органах инфицированных животных с помощью ПЦР / Сборник научных трудов ВГНКИ, 2003.– Т.64.– с.183–194.
5. Викторова Е.В. Обнаружение лептоспир в органах и тканях животных с помощью ПЦР / Лептоспироз: материалы 10-й Всерос. науч.–практ. конф. по лептоспирозу, Анапа.– 18–20 сент.– 2003г. // Рос. акад. с.–х. наук, Кубан. гос. мед. акад., Краснодар.– Науч.–исслед. вет. ин-т и др.– М.; Краснодар, 2003.– с.93–94.
6. Малахов Ю.А., Панин А.Н., Викторова Е.В. Оценка лабораторных методов диагностики лептоспироза животных / Лептоспироз: материалы 10-й Всерос. науч.–практ. конф. по лептоспирозу, Анапа.– 18–20 сент.– 2003 г. // Рос. акад. с.–х. наук, Кубан. гос. мед. акад., Краснодар.– Науч.–исслед. вет. ин-т и др.– М.; Краснодар, 2003.– с.108–111.
7. Викторова Е.В. Сравнительная оценка различных методов выявления патогенных лептоспир / Сб. научн. трудов ВГНКИ. – т. 65. – М. – 2005. с. 129-137.
8. Панин А.Н., Малахов Ю.А., Викторова Е.В. Меры борьбы с лептоспирозом животных / «Ветеринария», 2005. - № 7. - с.3-6
9. Викторова Е.В. Применение полимеразной цепной реакции при изучении органотропности лептоспир / Сб. научн. трудов ВГНКИ. - т. 66. – М. – 2005. – с. 193-202.
10. Брюсова М.Б., Давыдова Е.Е., Обухов И.Л., Викторова Е.В., Малахов Ю.А., Панин А.Н., Карань Л.С., Шипулин Г.А. Разработка тест-систем для идентификации патогенных лептоспир / Тезисы докладов Всероссийской конференции ВГНКИ. – М. – 2005. – с. 29-30.

ГНУ ВНИИВСГЭ.

Москва, Звенигородское ш., 5

Заказ 214/2. Тираж 100 экз.