

УДК 619:616-07

**Чужебаева Г.Д.**, кандидат ветеринарных наук, кафедры ветеринарной санитарии, заведующая испытательной лабораторией производства продуктов питания научно-исследовательского центра

**Бейшова И.С.**, кандидат сельскохозяйственных наук, заведующая отделом молекулярно-генетических исследований испытательной лаборатории производства продуктов питания научно-исследовательского центра

**Исмагамбетов И.Г.**, магистрант

РГП на ПХВ «Костанайский государственный университет имени Ахмета Байтурсынова», г. Костанай, Республика Казахстан

## **ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЦР ПРИ ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

### **Аннотация**

В статье представлены результаты сравнительных исследований бруцеллеза крупного рогатого скота методами реакции агглютинации, реакции связывания комплемента, полимеразно-цепной реакции.

Иммунологические исследования являются основными методами выявления больных и подозрительных по заболеванию животных и носят плановый характер при обследовании на бруцеллёз. Серологические методы позволяют прижизненно выявить иммунологическую перестройку в инфицированном организме животного. Одним из перспективных направлений диагностики бруцеллеза является использование молекулярно-генетических методов выявления дезоксирибонуклеиновых кислот бруцелл, в частности полимеразно-цепной реакции. Генетическая обособленность рода *Brucella* обуславливает 100 %- ную специфичность молекулярно-биологических методов диагностики бруцеллеза. Применение полимеразно-цепной реакции позволяет достичь высокой чувствительности, специфичности диагностики бруцеллеза и обеспечить оперативность анализа.

Важной задачей для ветеринарной практики является идентификация видов, штаммов и биоваров бруцелл. Широкое применение живых противобруцеллезных вакцин, как средства специфической профилактики бруцеллеза, и длительная циркуляция вакцинного штамма в организме иммунизированного крупного рогатого скота делает актуальной проблему дифференциации вакцинных штаммов.

Целью исследований явилось изучение диагностической значимости полимеразной цепной реакции при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота.

**Ключевые слова:** бруцеллез, крупный рогатый скот, диагностика, полимеразная цепная реакция, реакция агглютинации, реакция связывания комплемента.

**Введение** Ликвидация бруцеллеза представляет собой мировую проблему для медицинского и ветеринарного здравоохранения. Несмотря на значительный прогресс в контроле и борьбе с инфекционными заболеваниями, бруцеллез остается одной из самых важных зоонозных инфекций, с огромным ареалом распространения. Существует много различных факторов, которые препятствуют полной и устойчивой ликвидации бруцеллеза животных. Эффективность борьбы с бруцеллезом напрямую зависит от эффективности диагностических мероприятий, которые в первую очередь должны быть направлены на раннее выявление инфекции [1].

В ветеринарии официально регламентированы методы обнаружения специфических противобруцеллезных антител: РА, РСК, РДСК, РИД с О-

ПС-антигеном, пластинчатая реакция агглютинации с розбенгал антигеном (РБП), кольцевая реакция с метиленовым синим (КР).

Известно, что существующий комплекс серологических реакций имеет ряд недостатков, которые снижают качество диагностики бруцеллеза.

Общность определенных фрагментов антигенной структуры бруцелл и *Y enterocolitica* 0:9, *S. urbana*, *F. tularensis* часто обуславливает наличие перекрестных реакций [2]. Широкая вариабельность антигенных свойств микроба, вследствие диссоциации, осложняет выбор соответствующей гипериммунной сыворотки для проведения реакций [3]. Кроме того, индивидуальные особенности антителогенеза, выражаемые в крайне низком уровне продукции иммуноглобулинов, оказывающегося за гранью порога чувствительности используемых методов иммуноанализа, и наличие, так называемых, неполных антител, имеющих диагностическое значение, которые, однако, не обнаруживаются данным комплексом тестов, не позволяют в полной мере выявить всех инфицированных животных. Некоторые авторы справедливо отмечают, что данный комплекс (РА+РСК+РБП+КР) не является истинным комплексом, поскольку даёт односторонний результат, выявляя только полные антитела [4].

Молекулярно-биологические методы анализа, в частности, полимеразная цепная реакция (ПЦР), не зависят от стадии инфекционного процесса, иммунного статуса организма и являются весьма перспективными для быстрого и точного обнаружения возбудителя бруцеллеза.

**Цель исследования** - изучение эффективности ПЦР при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота

**Материалы и методы исследований.** Исследования проведены в иммунобиологическом и молекулярно-генетическом отделах научно-инновационном центре Костанайского государственного университета имени А. Байтурсынова

Исследовано методами РБП, РА, РСК со стандартными антигенами 195 проб сыворотки крови и 43 пробы цельной крови КРС, 40 проб молока коров.

Серологические исследования (РБП, РА, РСК) проводили согласно наставления по серологической диагностике бруцеллеза.

Исследования методом ПЦР проводили с применением тест-системы «Бру-Ком» (Интерлабсервис, г. Москва), согласно инструкции производителя.

**Результаты исследований.** В последние годы в практике диагностических лабораторий успешно используются ПЦР-тест-системы для диагностики бруцеллеза, а сам метод официально регламентирован для применения в медицине и ветеринарии [5].

Тем не менее, остаются неизученными вопросы сравнительной эффективности ПЦР и традиционных лабораторных методов диагностики бруцеллеза, а также возможности применения ПЦР в комплексе с другими тестами для повышения диагностической точности анализа. Исходя из вышесказанного, нами был проведен сравнительный анализ эффективности методов ПЦР, РА, РСК, а также оценка комплексного применения этих методик. С использованием вышеназванных методов исследовали 195 сывороток крови невакцинированного против бруцеллеза крупного рогатого скота. Пробы сывороток крови, цельной крови и молока взяты из хозяйств Костанайской области, где были выявлены больные бруцеллезом животные. В качестве отрицательного контроля анализировали 10 проб сыворотки крови от здоровых животных из благополучного хозяйства. Из числа исследованных проб методами РБП, РА, РСК выявлено 42 положительных (таблица 1).

Таблица 1 - Результаты сравнительного изучения серологических реакций и ПЦР при обследовании на бруцеллез крупного рогатого скота

| № пробы                                                                                         | Количество проб | РБП | РА | РСК | ПЦР |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----|----|-----|-----|
| 6,8,11,13,15,16,17, 20, 21, 28, 30, 35,36,37,38,39,40,41,42,44, 45,50-56, 71,72,73,81           | 32              | +   | +  | +   | +   |
| 115,118                                                                                         | 2               | -   | +  | -   | +   |
| 19, 49, 48, 116, 184, 165                                                                       | 6               | -   | -  | -   | +   |
| 1-5, 7, 9,10, 12,14,18, 23-27, 29, 31-34, 43,46,47, 57 -70, 74-80, 82-114, 117, 119-183,185-195 | 155             |     | -  | -   | -   |
| Контрольные пробы                                                                               | 5               | -   | -  | -   | -   |

Анализ результатов исследований ПЦР и серологических методов показал, что в сыворотках крови 34 из 195 обследованных животных выявлены специфическая ДНК и противобруцеллезные антитела в диагностическом титре (17,4%). При этом наибольшее количество положительно реагирующих животных выявлено в ПЦР – 40 (20,5%), в то время как в РА зарегистрировано 34 (17,4 %), а в РСК - 32 (1,02 %) положительных ответов.

При исследовании сывороток крови контрольной группы животных во всех случаях в ПЦР, РА и РСК получили отрицательные результаты (рисунок 1).

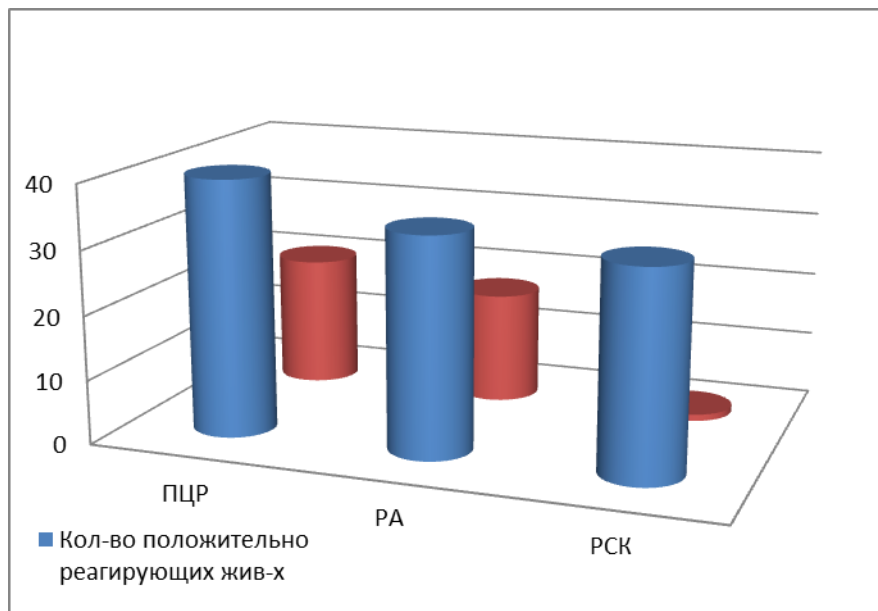


Рисунок 1 - Частота положительных результатов при использовании серологических методов лабораторной диагностики бруцеллеза и ПЦР

Как видно из таблицы, положительные результаты РА и РСК были полностью подтверждены в ПЦР, при этом наибольшее число совпадений отмечено с реакцией агглютинации. Результаты исследования отдельных сывороток крови, положительных в ПЦР и отрицательных при всех серологических тестах, по всей вероятности, свидетельствуют о том, что у животных, от которых они получены, титр специфических антител в крови ниже диагностического. Это может быть обусловлено особенностями начальной стадии формирования иммунного ответа или недостаточным антителогенезом вследствие иммунодефицита, многократного и чрезмерного антигенного раздражения. Не исключена циркуляция антител, гомологичных SR- и R-формам бруцелл, которые не улавливаются стандартными диагностикумами для РА и РСК [6].

Применение ПЦР в комплексном анализе позволило обнаружить дополнительно 6 инфицированных животных, что составило 15 % от общего числа выявленных. Высокая эффективность ПЦР по сравнению с серологическими методами обусловлена чувствительностью реакции, которая в данном случае была в 1,2 раза выше, чем у РА и РСК. Это согласуется с данными многих других исследований.

Таким образом, происходящие после инфицирования изменения в организме могут быть выявлены, как хорошо зарекомендовавшими серологическими методами (в том числе РА и РСК), но методом ПЦР ДНК бруцелл выявляется сравнительно чаще.

Оценка информативности ПЦР-анализа при исследовании различных образцов диагностического материала

Наличие инфекционного агента в различных биологических жидкостях организма животного при бруцеллезе отличается непостоянством и стадийностью [7] Первая стадия бруцеллезной инфекции - первичная латенция, характеризуется накоплением бруцелл в регионарных лимфоузлах.

Вторая стадия - генерализация, отличается бактериемией и диссеминацией возбудителя в организме. На данный момент становятся возможными иммунологические и бактериологические исследования различного биологического материала.

Третья стадия - вторичная латенция, характеризуется локализацией бруцелл, как правило, в L-форме, в специфических гранулемах. Большинство методов лабораторной диагностики бруцеллеза, кроме ПЦР, в этот период являются малоэффективными.

От 22 голов коров давших положительные результаты при исследовании на бруцеллез методами РА, РСК были взяты пробы молока, и после убоя на убойном пункте кусочки паренхиматозных органов и лимфоузлов, также влагалищная слизь для исследования методом ПЦР и дальнейших бак. исследований (рисунок 2).

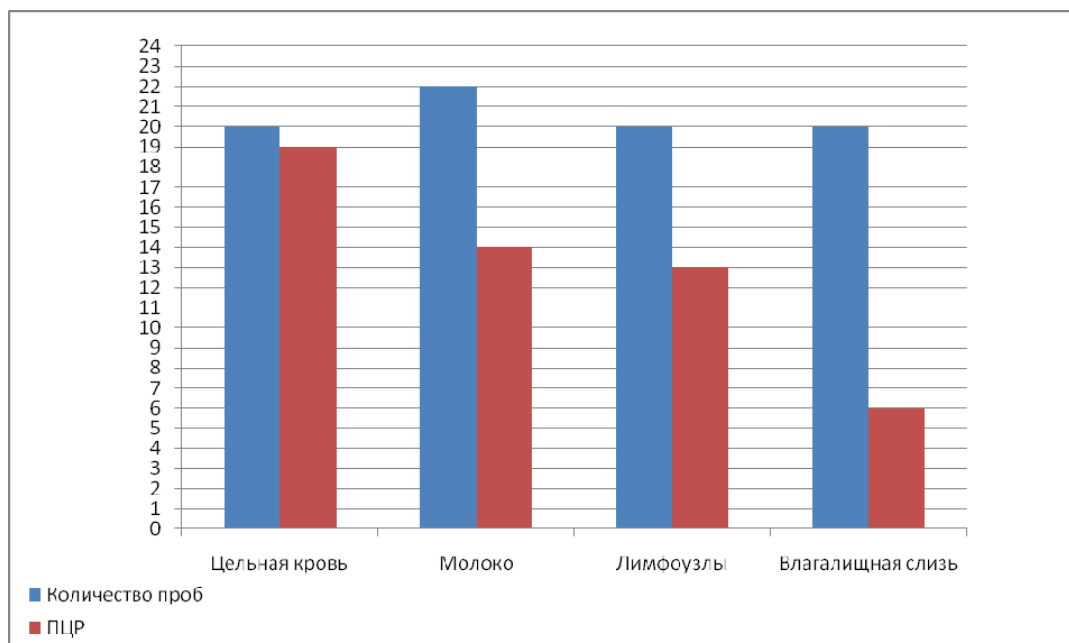


Рисунок 2 – Результаты исследования различных образцов биоматериала методом ПЦР на бруцеллез

Анализ показал, что наибольшее количество положительных результатов получено при исследовании проб цельной крови (95%). Результативность анализа в данном случае определяется концентрацией возбудителя в крови, которая в период генерализованной инфекции может достигать  $1 \times 10^4$  м.к./мл [8]. В научной литературе, в дополнение к вышесказанному имеются многочисленные сведения о внутрифагоцитарной персистенции возбудителя бруцеллеза [9]. Таким образом, длительное наличие бруцелл в крови может обуславливать высокую диагностическую ценность последней и стабильное выявление ДНК бруцелл в ПЦР.

ДНК бруцелл при исследовании лимфоузлов выявлено в 13 пробах из 20 исследованных (65%).

Многими специалистами отмечено, что у 50-70 % лактирующих коров бруцеллы продолжительное время выделяются с молоком [9]. В определенных случаях частота выделения бруцелл из молока может быть в 1,5-2 раза выше, чем из влагалищной слизи и лимфоидных органов.

В наших исследованиях методом ПЦР ДНК возбудителя в молоке выявлено в 63,6 % случаев. Наличие бруцелл в молоке обусловлено образованием в вымени первичных и вторичных (гематогенных) очагов инфекции и локализацией возбудителя (особенно S-форм) в макрофагах молочной железы [10]. Возможность детекции ДНК бруцелл в молоке показана многими авторами. Максимальная чувствительность ПЦР-анализа при этом составила  $2,8 \times 10^2$

м.к./мл . Поэтому молоко может быть использовано как материал для ПЦР-анализа при исследовании на бруцеллез.

С током крови и лимфы бруцеллы могут попадать в матку и другие половые органы, вызывая развитие эндометритов, вагинитов, вульвовагинитов. Данное обстоятельство указывает на возможность использования в качестве диагностического материала для ПЦР образцов слизи цервикального канала. ДНК бруцелл в наших исследованиях выявлено в 6 пробах влагалищной слизи из 20 (30%). Получение проб в данном случае достаточно простое, что дает возможность охватить при исследовании большое количество животных.

Таким образом, при исследованиях на бруцеллез необходимо учитывать вид биологического материала и стадию течения болезни.

#### **Выводы.**

Результаты проведенных нами исследований позволяют заключить:

- ПЦР превосходит по эффективности регламентированные «Наставлением по диагностике бруцеллеза животных» серологические методы (РА и РСК).
- при обследовании поголовья животных важное значение для лабораторной диагностики бруцеллеза приобретает правильный выбор исследуемого биологического материала.
- наши результаты согласуются с многочисленными данными в научной литературе.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Григорьева Г.И., Сочнев В.В., Бацанов Н.П., Филиппов Н.В. Бруцеллы и бруцеллез. Микробиология, иммунология и биотехнология. - Н. Новгород. - 1998. - 245 с.
2. Вершилова П.А., Чернышева М.И., Князева Э.Н. Патогенез и иммунология бруцеллеза (экспериментальные данные). - М.: Медицина. - 1974. - 272 с
3. Желудков М. М. Бруцеллез в России: современная эпидемиология и лабораторная диагностика : автореф. ... канд. с.-х. наук: 14.00.30. - Москва, 2009. - 66 с.
4. Дегтяренко Л.В., Разницина Г.В., Аракелян П.К. Диагностическое значение реакции непрямой гемагглютинации при обнаружении бруцеллезных антител в молоке крупного рогатого скота // Бруцеллез сельскохозяйственных животных // Сб. научных трудов ВНИИБТЖ. – Омск, 1989. - С. 45-52.
5. Romero C., Gamazo C., Padro M., Lopez-Coni I. Specific detection of Brucella DNA by PCR // J. Clin. Microbiol. - 2005. - V. 33. - P. 615-617.
6. Григорьева Г.И., Сочнев В.В., Бацанов Н.П., Филиппов Н.В. Бруцеллы и бруцеллез. Микробиология, иммунология и биотехнология. - Н. Новгород. - 2008. - 245 с.
7. Косилов И.А., Аракелян П.К., Димов С.К., Хлыстунов А.Г. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. - Новосибирск, 2000. - 342 с.
8. Приказ № 350 МСХ и П РФ. Наставления по диагностике бруцеллеза животных. - 2000. - <http://www.alppp.ru/law/hozjajstvennaja-dejatelnost/selskoe-hozjajstvo/61/instrukcija-o-meroprijatijah-po-profilaktike-i-likvidacii-brucelleza-zhivotnyh.html>
9. Rijpens N.P., Jannes G., Van Asbroeck M. Direct detection of Brucella spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes // Appl. Environ. Microbiol. - 1996. - V. 62. - P. 1683-1688.
10. Желудков М.М., Горшенко В.В., О.С.Хадарцев и др. Бруцеллез: современная эпидемиология и эпидемиологический надзор // матер. IX съезда Всеросс. науч.-практ. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – М., 2007. – Т. 1. – С.148-149.

#### **ТҮЙІН**

Мақала аглютинация реакциясы, комплиментті байланыстыру реакциясы, полимеразды тізбекті реакция әдістерін пайдалана отырып, ірі қара малдағы бруцеллездің салыстырмалы зерттеулерінің нәтижелерін ұсынады.

Иммунологиялық зерттеулер ауруға шалдыққан және күдікті жануарларды анықтаудың негізгі әдісі болып табылады және бруцеллезге тексерген кезде дағдылы түрде жүргізіліледі. Серологиялық әдістер жұқтырылған жануардағы иммунологиялық қайта құруды жануардың

тірі күйінде анықтауға мүмкіндік береді. Бруцеллезді белгілеу үшін үмітті бағыттардың бірі - бруцелла Дезоксирибонуклеин қышқылы - ларын анықтауға арналған молекулярлық-генетикалық әдістерді қолдану. Атап айтқанда - полимеразды тізбекті реакциясы. *Brucella*, бруцеллезді диагностикалау үшін, молекулярлық-генетикалық әдістердің нақтылығын 100% қамтамасыз етеді. Полимеразды тізбекті реакцияны қолдану - бруцеллезді диагностикалаудың жоғары сезімталдығына, нақтылығына және талдаудың тиімділігін қамтамасыз етуге мүмкіндік береді.

Ветеринариялық тәжірибе үшін маңызды міндет - *Brucella* түрлерін, штамдарды және биоварларды анықтау. Бруцеллездің ерекше профилактикасы құралы ретінде тірі антибруцелла вакциналарын кеңінен пайдалану және иммунизирленген малдың ағзасындағы вакцина штамдарының ұзақ мерзімді айналымы вакцина штамдарын дифференциациялаудың өзекті мәселесін тудырады.

Зерттеудің мақсаты ірі қара малдағы бруцеллезді анықтау кезіндегі полимеразды тізбекті реакцияның диагностикалық маңыздылығын зерттеу болды.

### **RESUME**

The article presents the results of comparative studies of brucellosis in cattle using the methods of agglutination reaction, complement fixation reaction), polymerase chain reaction.

Immunological studies are the main methods for identifying sick and suspicious animals for the disease and are routine when examined for brucellosis. Serological methods allow in vivo to identify the immunological rearrangement in the infected animal body. One of the promising areas for the diagnosis of brucellosis is the use of molecular genetic methods for the detection of *Brucella* Deoxyribonucleic Acid, in particular polymerase chain reaction. Genetic isolation of the genus *Brucella* determines the 100% specificity of molecular biological methods for the diagnosis of brucellosis. The use of polymerase chain reaction allows to achieve high sensitivity, specificity of diagnosis of brucellosis and ensure the efficiency of the analysis.

An important task for veterinary practice is the identification of *Brucella* species, strains and biovars. The widespread use of live antibrucella vaccines as a means of specific prophylaxis of brucellosis, and the long-term circulation of the vaccine strain in the body of immunized cattle make an urgent problem of differentiation of vaccine strains.

The aim of the research was to study the diagnostic significance of the polymerase chain reaction in the diagnosis of bovine brucellosis in cattle.

УДК 619:616.24-002.5:636.2

**Чужебаева Г.Д.**, кандидат ветеринарных наук, кафедры ветеринарной санитарии, заведующая испытательной лабораторией производства продуктов питания научно-исследовательского центра

**Тохтарова Б.А.**, магистр ветеринарных наук, преподаватель кафедры ветеринарной санитарии

**Кужухова Н.Т.**, магистрант

Костанайский государственный университет имени А. Байтурсынова, г. Костанай, Республика Казахстан

### **ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ И ЕЁ ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ТУБЕРКУЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

#### **Аннотация**

В статье представлены результаты послеубойной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота на убойном пункте «BEEFSTREAM» Костанайского района с применением современных лабораторных методов исследования, с целью определения роли и места полимеразной реакции при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота.