

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.

Приведены результаты сравнительного анализа послеубойной экспертизы, бактериологического метода и полимеразной цепной реакции. В результате исследований выделены культуры микобактерий туберкулеза вида *Mycobacterium bovis*.

Применение полимеразной цепной реакции для послеубойной диагностики туберкулёза крупного рогатого скота позволяет обнаружить ДНК возбудителя туберкулёза в патологическом материале при наличии или отсутствии видимых патологоанатомических и патоморфологических изменений.

Из исследованных с применением метода полимеразно-цепной реакции (ПЦР) проб биоматериала от 24 реагировавших на туберкулез животных из 106 забитых на убойном пункте «BEEFSTREAM» голов крупного рогатого скота, ДНК возбудителя туберкулеза выявлен в 16 случаях.

Методом ПЦР были исследованы пробы паренхиматозных органов, крови и мочи от каждого животного. Провели дополнительные исследования методом ПЦР ранее засеянного верхнего слоя питательной среды.

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

Ключевые слова: туберкулез, послеубойная экспертиза, диагностика, полимеразная цепная реакция, бактериологическое исследование.

Введение. Туберкулез является опасным заболеванием животных и людей и имеет широкое распространение в мире. Среди сельскохозяйственных животных данная инфекция особо опасна для крупного рогатого скота (КРС).

В настоящее время диагностика туберкулеза крупного рогатого скота имеет две основные проблемы: с одной стороны, выявление здоровых животных с парааллергическими или неспецифическими реакциями на туберкулин в благополучных хозяйствах, а с другой, недовыявление зараженных туберкулезом животных в неблагополучных хозяйствах. Поэтому, при проведении исследований на туберкулез в благополучных хозяйствах необходимо повысить специфичность, а в неблагополучных - чувствительность диагностических исследований [1].

Лабораторная диагностика туберкулеза отличается продолжительностью выполнения и относительно низкой эффективностью. Срок бактериологического исследования составляет 3 месяца. Эффективность бактериологического метода зависит от качества питательных сред, концентрации возбудителя в исследуемом материале, степени загрязненности последнего посторонней микрофлорой и времени, прошедшего с момента заражения животного [2].

Преимущества ПЦР в лабораторной диагностике связаны с быстротой, высокой чувствительностью и специфичностью, что позволяет обнаруживать микроорганизмы, имеющиеся в исследуемом материале в очень малом количестве.

Тест-системы на основе ПЦР эффективны при диагностике трудно культивируемых и персистирующих форм патогенных бактерий [3].

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

Материалы и методы исследований. Работа выполнена в период 2017–2018 годы в отделах микробиологического анализа и молекулярно-генетических исследований научно-исследовательском центре Костанайского государственного университета имени А. Байтурсынова.

Бактериологические исследования на туберкулез проводили согласно методических рекомендаций по бактериологической и биохимической идентификации микобактерий [4].

Биоматериал от животных обрабатывали по методу Аликаевой: кусочки лимфатических узлов и органов измельчали в ступке ножницами, растирали пестиком и заливали 3% раствором серной кислоты. Пробу центрифугировали в течение 20 минут при 3000 об/мин. Затем надосадочную жидкость сливали, осадок суспендировали изотоническим раствором, и снова

центрифугировали при 3000 об/мин, при той же экспозиции, эта операция повторялась трехкратно.

Полученную взвесь микобактерий использовали для проведения бактериологических, биологических и микроскопических исследований.

Бактериологическое исследование проводили путем посева на питательные среды Левенштейна – Йенсена, Гельберга.

Пробирки с посевами инкубировали в термостате при 37 °С. Наличие роста микобактерий регистрировали через четверо суток, затем через 7 суток и 30 дней. Наблюдение за посевами вели в течение 3 месяцев.

Для проведения микроскопических исследований готовили мазки, которые окрашивали по Циль – Нильсену. В случае наличия в препарате микобактерий регистрировали наличие отдельно лежащих рубиново-красных палочек [5,6].

Для ПЦР-исследований использовали тест-системы: «МТБ-КОМ-FRT» производства ФГУ ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦНИИЭ). Полимеразную цепную реакцию проводили согласно наставлению производителя.

Результаты исследований. Для изучения диагностической значимости полимеразной цепной реакции и определения его роли при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота проводили послеубойный осмотр туш на секции на убойном пункте «BEEFSTREAM» в период с ноября 2017 года по сентябрь 2018 года (таблица 1)

Таблица 1. Количество реагировавших животных, забитых на убойном пункте «BEEFSTREAM» с 25.11.17г. по 30.09.18

№ п/п	Наименование хозяйств	Статус по туберкулезу	Количество забитых животных
1	ТОО «АСХОС»	неблагополучное	45
2	ТОО «АСХОС»	неблагополучное	26
3	ТОО «АСХОС»	неблагополучное	28
4	КХ «Сейдалин Б.Х»	благополучное	1
5	КХ «Ашутас»	благополучное	2
6	КХ «Тушиев С»	благополучное	1
7	Частный сектор Сарыкольский район	благополучное	3
	Всего		106

Как видно из таблицы, всего за период на убойном пункте «BEEFSTREAM» с ноября 2017 года по сентябрь 2018 г. было забито 106 голов КРС, реагировавших на туберкулиновую пробу. Из них 99 голов из неблагополучных и 7 из благополучных по туберкулезу хозяйств. Результаты послеубойной экспертизы туш КРС в разрезе хозяйств представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты послеубойной экспертизы туш КРС в разрезе хозяйств

№ п/п	Наименование хозяйства	Количество животных на убой	Количество туш, в которых выявлены туберкулезные изменения при послеубойной экспертизе	Процент выявленных больных
1	ТОО «АСХОС»	26	2	7,6
2	ТОО «АСХОС»	45	4	8,8
3	ТОО «АСХОС»	28	2	7,1
4	КХ «Сейдалин Б.Х»	1	1	100,0
5	КХ «Ашутас»	2	-	0
6	КХ «Тушиев С»	1	-	0
7	Частный сектор Сарыкольский район	3	2	66,0

Как видно из таблицы, при послеубойном осмотре положительно реагирующих на туберкулин туш КРС, были выявлены изменения, характерные для туберкулеза. Чаще всего изменения наблюдали в средостенных лимфоузлах, но в некоторых тушах были поражены и внутренние органы. Всего при послеубойном осмотре 106 туш скота, туберкулез был подтвержден в 11 случаях, также были выявлены другие заболевания (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты ветеринарной экспертизы убитых животных

Количество убитых животных	Паткартина туш убитых на секции животных									
	Туберкулез		Эхинококкоз		Поражения печени		Лейкоз		Без видимых изменений	
	туш	%	туш	%	туш	%	туш	%	туш	%
106	11	10,3	26	24,5	12	11,3	3	2,8	54	50,9

Из таблицы 3 видно, что туберкулез при осмотре туш был выявлен в 11 случаях (10,3%), эхинококкоз в 26 случаях (24,5%), лейкоз лишь в 3 случаях (2,8%), поражения печени различного характера (гепатиты, гепатозы) в 12 случаях (11,3%). В 54 тушах никаких изменений не выявлено (50,9%) (рисунок 1).

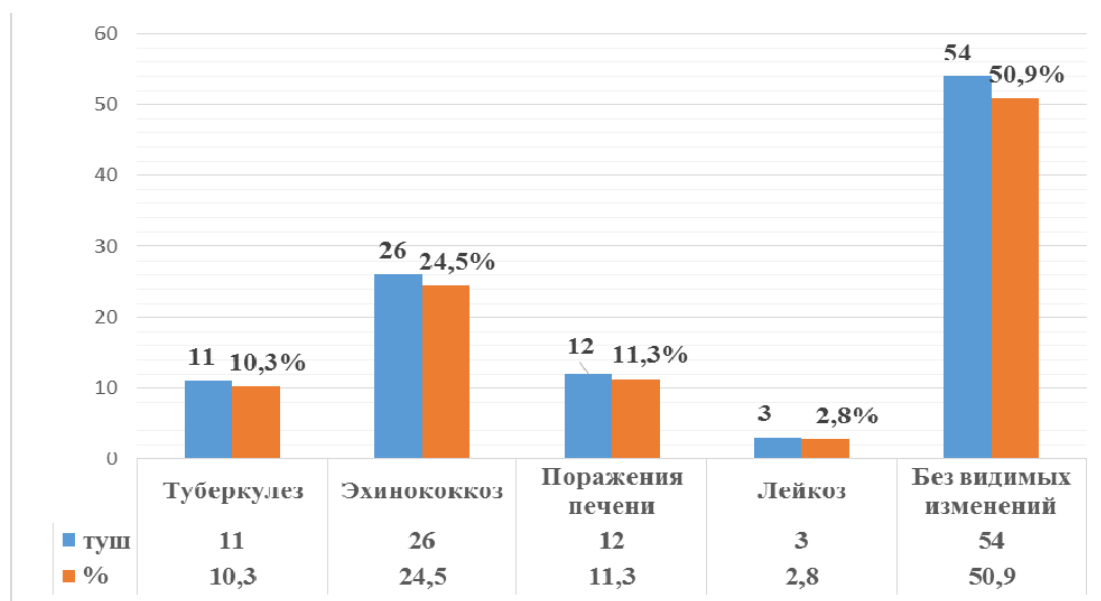


Рисунок 1 – Результаты послеубойной экспертизы туш

У всех забитых 106 туш животных были взяты пробы внутренних органов (печень, легкие) и лимфоузлы целиком (средостенные, заглочные, легочные) и доставлены в отдел микробиологического анализа научно-исследовательского центра для лабораторных исследований. При этом культуры микобактерий были выявлены из биоматериала от одиннадцати туш с выявленными туберкулезными изменениями. Всего от 11 туш было доставлено по 5 проб из разных органов.

В таблице 4 приведены результаты бактериоскопических и бактериологических исследований 11 туш.

Таблица 4 - Результаты бактериологического исследования

№ п/п	Инвентарный номер туши	Органы для исследования	Микроскопия	Результат бактериологического исследования
1	KZP100461239	Легкие, л/узлы	+	положительный
2	KZP157808716	Печень, легкие, л/узлы	+	положительный
3	KZP157808856	Печень, легкие, л/узлы	-	отрицательный
4	KZP158252673	Легкие, л/узлы, печень	+	положительный
5	KZP157640542	Печень, легкие, л/узлы	-	отрицательный
6	KZP157868989	Печень, легкие, л/узлы	+	отрицательный
7	KZP158285491	Печень, легкие, л/узлы	-	положительный
8	KZP158285576	Легкие, л/узлы	+	отрицательный
9	KZP158257348	Легкие, л/узлы	-	положительный
10	KZP158252673	Печень, легкие, л/узлы	-	отрицательный
11	KZP157868989	Печень, легкие, л/узлы	-	отрицательный

Как видно из таблицы 4, при бактериологическом исследовании отобранных проб материала с характерными изменениями от 11 туш животных, микобактерии туберкулеза выделены лишь от 5 туш. В 2 случаях микроскопически микобактерии не были выявлены, тогда как бактериологически из этих проб были выделены микобактерии.

Далее методом полимеразной цепной реакции были исследованы пробы биоматериала от 24 туш.

Кроме того от всех животных перед убоем были взяты пробы крови, мочи и паренхиматозных органов для ПЦР анализа (таблица 4, рисунок 2).

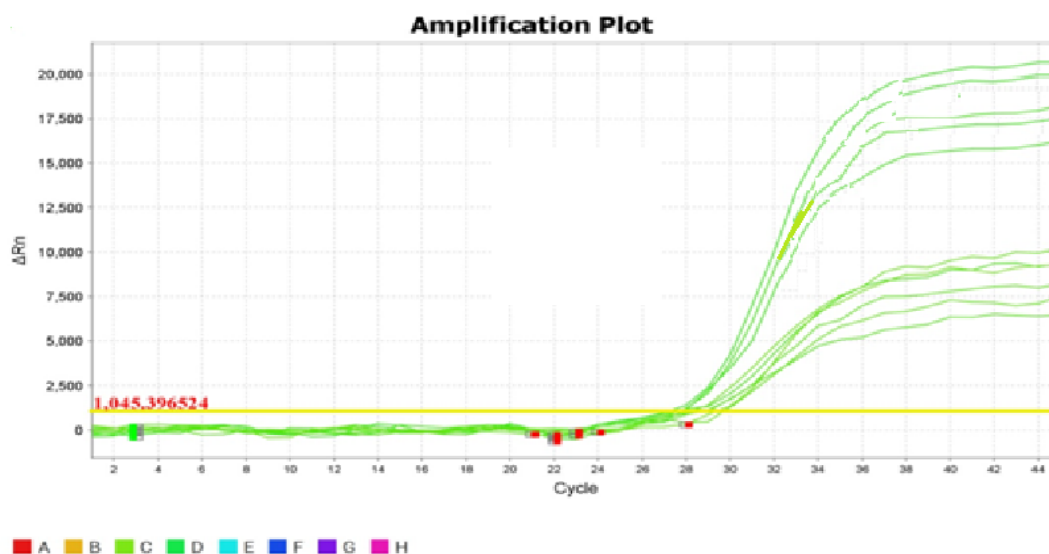


Рисунок 2 – Результаты исследования методом ПЦР 11 проб биоматериала КРС

Таблица 5- Сравнительный анализ результатов исследований

№ п/п	Инвентарный номер	Послеубойные исследования	Исследование методом полимеразной цепной реакции			Бактериологическое исследование	Исследование верхнего слоя питательной среды ПЦР-методом
			паренхиматозных органов	крови	мочи		
1.	KZP100461239	+	+	+	+	<i>M.bovis</i>	+
2.	KZP157808716	+	+	+	+	<i>M.bovis</i>	+
3.	KZP157808856	+	+	+	+	<i>M.bovis</i>	+
4.	KZP158252673	+	+	+	+	<i>M.bovis</i>	+
5.	KZP157640542	+	+	+	+	<i>M.bovis</i>	+
6.	KZP157868989	+	+	+	+	<i>M.bovis</i>	+
7.	KZP158285491	+	+	+	+	<i>M.bovis</i>	+
8.	KZP158285576	+	+	+	+	<i>M.bovis</i>	+
9.	KZP158257348	+	+	+	+	<i>M.bovis</i>	+
10.	KZP158252673	+	+	+	+	<i>M.bovis</i>	+
11.	KZP157868989	+	+	+	+	<i>M.bovis</i>	+
12.	KZP157868702	-	-	-	-	-	-
13.	KZP158196189	-	-	-	-	-	-
14.	KZP158211455	-	+	-	+	-	+
15.	KZP158233372	-	-	-	-	-	-
16.	KZP158257347	-	+	+	+	-	+
17.	KZP158257521	-	-	-	-	-	-
18.	KZP158255421	-	-	-	-	-	-
19.	KZP158285422	-	-	-	-	-	-
20.	KZP158285439	-	-	-	+	-	+
21.	KZP158285440	-	-	+	+	-	+
22.	KZP158285435	-	-	-	-	-	-
23.	KZP158252600	-	-	-	-	-	-
24.	KZP158285491	-	+	+	+	-	+

Методом ПЦР были исследованы пробы паренхиматозных органов, крови и мочи от каждого животного. Учитывая слабый рост культур микобактерий на питательных средах и отрицательные результаты ПЦР при исследовании проб биоматериала от забитых животных, мы провели дополнительные исследования методом ПЦР ранее засеянного верхнего слоя питательной среды.

Из данных таблицы видно, что при исследовании проб биоматериала методом традиционного посева на питательные среды, рост культур *M. bovis* был выявлен в 11 случаях.

При исследовании суспензии с верхнего слоя плотной питательной среды методом ПЦР, ДНК возбудителя *M. bovis* обнаружен в 16 пробах, паренхиматозных органов – в 14 пробах, крови - в 14 пробах, мочи - в 16 пробах.

При исследовании мочи и суспензии с верхнего слоя питательной среды реагировавших на туберкулез животных методом ПЦР получено на 2 положительных результата больше (16/66,6%), чем при исследовании крови и паренхиматозных органов (14/58,3%).

Обсуждение результатов. Анализируя полученные результаты исследований, можно заключить, что методом ПЦР выявляется больше больных животных, чем при послеубойном осмотре и бактериологическом исследовании. Согласно полученным результатам можно предположить, что при посеве суспензии патматериала на питательные среды происходит накопление возбудителя *M. bovis* на поверхности питательной среды, который затем выявляется методом ПЦР. При исследовании проб мочи ДНК микобактерий выявляется чаще, чем при исследовании проб крови и органов.

Из исследованных с применением метода ПЦР проб биоматериала от 24 реагировавших на туберкулез животных из 106 забитых на убойном пункте «BEEFSTREAM» голов крупного рогатого скота, ДНК возбудителя туберкулеза выявлен в 16 случаях. Можно предположить, что 8 голов скота из числа исследованных отправлено на убой необоснованно. При исследовании всех 106 голов количество необоснованно убитых животных оказалось бы больше.

Заключение. При лабораторной диагностике туберкулеза крупного рогатого скота метод ПЦР следует использовать в целях диагностики и идентификации микобактерий туберкулеза. Метод ПЦР может быть использован как дополнительный экспресс-метод при исследовании патматериала от убитых с диагностической целью животных. Но, широкое применение метода ПЦР в лабораторной диагностике туберкулеза ограничивает высокая стоимость анализа.

Единственным методическим подходом, способным доказать наличие в образце некультивируемых форм возбудителя, при отсутствии роста колоний на пробирках с питательной средой, является полимеразная цепная реакция.

Современная диагностика туберкулеза, по мнению многих исследователей должна разумно сочетать традиционные и новейшие технологии с целью получения быстрого и точного результата анализа, что соответствует задачам по контролю туберкулеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коваленко А.М., Коваленко Л.В. Диагностика и профилактика туберкулеза животных. – Белгород, 2010. - 237 с.
2. Тургенбаев, К.А. Туберкулез крупного рогатого скота (диагностика и профилактика): автореф. ... док. вет. наук: 06.02.02. - Алматы, 2002. – 48 с.
3. Борисова Т.А. Современные ПЦР-системы для индикации и идентификации микобактерий и диагностическая значимость полимеразной цепной реакции при туберкулезе крупного рогатого скота: автореф. ... канд. вет. наук: 03.00.07. - Казань, 2014. – 24 с.
4. Коромыслов, Г.Ф., Овдиенко, Н.П., Шаров, В.А. и др. Методические рекомендации по проведению лабораторных исследований при туберкулезе животных: ВАСХНИЛ, ВНИИЭВ. - М., 1992. – 87 с.
5. Данко Ю.Ю. Оценка результатов бактериологических исследований при туберкулезе крупного рогатого скота: Современные проблемы профилактики и терапии заразных болезней

с.-х. животных и птиц // Сб. научн. трудов Ленинград. вет. инс-та. - Л, 1984. – Т. 80. – С. 24 – 27.

6. Гольшевская В.И., Корнеев А.А., Черноусова Л.Г. Применение новых микробиологических технологий в диагностике туберкулеза // Проблемы туберкулеза. – 1996. - № 6. - С. 22-24.

ТҮЙІН

Мақалада мал туберкулезін диагностикалауда полимеразды реакцияның рөлі мен орнын анықтау үшін зертханалық зерттеу әдістерімен Қостанай облысының «BEEFSTREAM» сою орталығында ірі қара малдың туберкулезін диагностикалаудың нәтижелері келтірілген.

Асадан кейінгі зерттеуді, бактериологиялық әдіспен және полимеразды тізбекті реакцияны салыстырмалы талдау нәтижелері келтірілген. Зерттеу нәтижесінде *Mycobacterium bovis* түріндегі туберкулездің микобактерия мәдениеттері ерекше көрсетілген.

Ірі туберкулездің кейіннен өлімін диагностикалау үшін полимеразды тізбекті реакцияны қолдану көрінетін патологиялық және патологиялық өзгерістері бар немесе көрінбейтін патологиялық материалдағы туберкулездің қоздырушы агентін ДНК-ын анықтауға мүмкіндік береді.

Туберкулезге әрекет жасаған 24 жануардың биоматериал үлгілерінен ПТР әдісін қолданып, «BEEFSTREAM» мал сою жерінде сойылған 106 қара малдың 16 туберкулез қозғалтушы ДНК 16өда көрсетілді.

ПТР әдісі әр жануардан паренхимозды органдардың, қан мен зәрдің үлгілерін зерттеу үшін пайдаланылды. ПТР-мен қоректік ортаны алдын-ала себілген жоғарғы қабаты арқылы қосымша зерттеулер жүргізілді.

Зерттеудің мақсаты ірі қара малдың туберкулезін диагностикалау кезінде полимеразды тізбекті реакцияның диагностикалық маңыздылығын зерттеу болды.

RESUME

The article presents the results of post-mortem diagnosis of cattle tuberculosis at the «BEEFSTREAM» slaughter center in Kostanay district using modern laboratory research methods to determine the role and place of the polymerase reaction in the diagnosis of cattle tuberculosis.

The results of a comparative analysis of post-mortem examination, bacteriological method and polymerase chain reaction are given in the article. As a result of research, *Mycobacterium bovis* species *Mycobacterium tuberculosis* cultures have been isolated.

The use of the polymerase chain reaction for the post-mortem diagnosis of bovine tuberculosis makes it possible to detect the DNA of the causative agent of tuberculosis in pathological material with or without visible pathoanatomical and pathological changes.

Of the biomaterial samples from 24 animals that reacted to tuberculosis from 106 animals that were slaughtered at the «BEEFSTREAM» slaughterhouse, which were examined using the PCR method, the DNA of the causative agent of tuberculosis was detected in 16 cases.

The PCR method was used to examine samples of parenchymatous organs, blood and urine from each animal. Conducted additional studies by PCR previously seeded upper layer of the nutrient medium.

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