DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-1-7

УДК:619:616-074/981.42/636.3

Преимущества применения полимеразной цепной реакции для диагностики бруцеллеза мелкого рогатого скота

Advantages of application of polymerase chain reaction for diagnosis of brucellosis of small ruminants

Расулов С.А.

г. Душанбе

РЕЗЮМЕ / SUMMARY

Ключевые слова: бруцеллез, мелкий рогатый скот, диагностика, профилактика, болезни, ПЦР.

Key words: brucellosis, sheep and goats, diagnosis, prevention, disease, PCR.

Для обеспечения населения высококачественной, экологически чистой животноводческой продукцией одной из важных задач является нахождение новых и модифицирование существующих методов диагностики, ликвидации и профилактики инфекционных болезней, в том числе и бруцеллеза сельскохозяйственных животных. В статье приведены результаты исследований патологического материала от абортингованных плодов мелкого рогатого скота бактериологическим методом, полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в Республике Таджикистан. Результаты выполненных исследований показали, что более чувствительным методом для выявления бруцеллеза у больных животных, генетического материала бруцелл в объектах внешней среды и биологическом материале является ПЦР. Обоснована его высокая диагностическая эффективность и универсальность использования для лабораторной диагностики бруцеллеза мелкого рогатого скота. Высокая чувствительность и специфичность ПЦР обеспечивает возможность верификации диагноза на всем протяжении инфекционного процесса (в острой, подострой и хронической стадиях болезни) и выявляет активность инфекционного процесса у животных с хроническим течением бруцеллеза при больших сроках давности.

In order to provide the population with high-quality, environmentally friendly livestock products it is of the high importance to modify, as well as to find new methods of diagnostics, elimination and prevention of infectious diseases including brucellosis of live-stock animals. The article contains the results of research of pathological material from aborted fetuses of small ruminants by bacteriological methods, polymerase chain reaction (PCR) in the Republic of Tajikistan.

The results have shown that PCR is more sensitive method for detection of brucellosis in affected animals, as well as of genetic material of *Brucella* in external medium and biological material. The article provides validation of PCR high diagnostic efficiency and versatility of use for laboratory diagnosis of brucellosis of small ruminants. High sensitivity and specificity of

PCR makes it possible to verify the diagnosis throughout the course of infection (acute, subacute and chronic stages of disease) and identify an active infection in animals with chronic brucellosis at the big limitations.

Бруцеллы - грамотрицательные, мелкие коккобактерии, способные к внутриклеточному размножению, могут инфицировать многие виды животных и людей, вызывая заболевание с высокой вероятностью перехода в хроническую форму течения. До недавнего времени, неблагоприятную эпизоотическую обстановку по бруцеллезу среди животных обуславливали 6 классических видов рода бруцелл. С начала третьего тысячелетия применение новых технологий привело к быстрому прогрессу в понимании многообразия бруцелл и, после многих лет перерыва, процесс расширения рода *Brucella* продолжается. В настоящее время признано одиннадцать разновидностей в пределах рода *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata*, *B. rapionis*. С эпизоотологических, эпидемиологических и экономических позиций, наиболее значимыми являются бруцеллы видов *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, представляющих опасность для всех видов сельскохозяйственных животных и человека [1, 2, 5].

Обеспечение населения высококачественной, экологически чистой животноводческой продукцией является основной задачей сельскохозяйственного производства во многих странах. Наиболее важными путями выполнения этой задачи являются нахождение новых и модифицирование существующих методов диагностики, ликвидации и профилактики инфекционных болезней, в том числе и бруцеллеза сельскохозяйственных животных [3, 4]. В данной статье приведены результаты сравнительного изучения эффективности разных методов исследования патологического материала из неблагополучных по бруцеллезу регионов Республики Таджикистан.

Материалы и методы

Исследовали на бруцеллез 33 абортингованных плода от мелкого рогатого скота из личного подворья в районах республиканского подчинения (РРП) и Хатлонской области Республики Таджикистан. Для бактериологических, бактериоскопических исследований и ПЦР (полимеразной цепной реакции) из абортингованных плодов отбирали содержимое желудка, паренхиматозные органы (печень, селезенка), а также подчелюстные, шейные, аксиллярные, паховые, парааортальные лимфатические узлы. Для микроскопии мазки окрашивали по методу Козловского и Шуляка-Шина. Для бактериологического исследования пробы патологического материала из абортингованных плодов высевали на плотные и жидкие питательные среды с селективной добавкой. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 30 суток и визуально проверяли через каждые 5 дней. На 18 сутки бруцеллы начинали давать характерный рост, на 20 сутки делали пересев на свежие питательные среды с селективной добавкой и соевый агар на чашках Петри. Для идентификации из полученных культур готови-

Информация об авторах / Information about the authors

Расулов С.А., аспирант Ветеринарного института Таджикской академии сельскохозяйственных наук

Мирзоев Д.М., д.в.н. академик ТАСХН, зав. кафедрой вет. института Таджикской академии сельскохозяйственных наук

¹Искандаров М.И., д.в.н., главный научный сотрудник, m-iskandarov@mail.ru

¹Федоров А.И., к.б.н., заведующий лабораторией

¹Искандарова С.С., научный сотрудник

¹Полякова И.В., к.б.н., в.н.с. лаборатории молекулярной биологии биотехнологии

¹Альбертян М.П., д.в.н., профессор, заведующий сектором

¹ФГБНУ ВНИИ экспериментальной ветеринарии имени Я.П. Коваленко

Rasulov S.A., Mirzoev D.M., Iskandarov M.I., Fedorov A.I., Iskandarova S.S., Albertyan M.P., Polyakova I.V.

ли мазки и окрашивали по методу Шуляка-Шина и Козловского, после чего проводили микроскопическое исследование их. Кроме того, изучаемые культуры исследовали в реакции агглютинации (РА) на стекле с агглютинирующими бруцеллезными S- и R- сыво-ротками крови, разведенными стерильным физиологическим раствором, в соотношении 1:10 и 1:50. При этом положительные пробы образовывали хлопья агглютината.

Результаты исследований и обсуждение

Из 33 проб патологического материала, предварительно (до бактериологического посева) исследованных методом бактериоскопии, в 10 случаях получили положительный результат на бруцеллез при окрашивании мазков по методу Шуляка-Шина, и в 14 случаях - при окраске мазков по методу Козловского. При исследовании патологического материала из аборттированных плодов по методу ПЦР в 26 пробах были выявлены фрагменты нуклеиновой кислоты (ДНК) возбудителя бруцеллеза мелкого рогатого скота, то есть эти пробы были положительными (Таблица 1.). Анализ результатов таблицы 1 показывает, что в целом, по данным исследования патологического материала из Хатлонской области и РРП, бактериоскопический метод, при окрашивании мазков по Козловскому, позволяет в 42,4% случаев выявить возбудителя бруцеллеза, а при окрашивании мазков по методу Шуляка-Шина - только в 30,3% случаев.

Исследование патматериала методом полимеразной цепной реакции позволяет получить положительный результат в 78,8% случаях, что на 36,4% больше, чем при бактериоскопическом методе. Кроме того, следует учесть, что бактериоскопический метод позволяет выявить микроорганизмы только морфологически и тинкториально сходные с истинным возбудителем, поэтому для дальнейшей идентификации необходим и бактериологический и серологический методы. По результатам бактериологического исследования после посева патологического материала на селективные питательные среды, в 18 пробах из 33 был выявлен характерный рост культур, подтвержденный серологически и бактериоскопически, что составляет 54,5%. Общее время бактериологического исследования с посевами и пересевами составило более 1 месяца (Таблица 2).

Таким образом, бактериологический метод позволил в 54,5% случаев выявить возбудителя бруцеллеза, тогда как методом ПЦР до и после бактериологического посева в 78,8% случаев получен положительный результат. Кроме того, метод ПЦР подтвердил до посева и после него все 18 положительных проб выявленных бактериоскопическим и бактериологическим методами, подтвержденных серологически в РА, и дополнительно ПЦР выявил 8 проб, что составляет 24,2%. В результате исследований установлено, что ПЦР позволяет получить положительный результат почти в 2 раза больше, чем при бактериоскопическом ис-

Табл. 1. Результаты исследования патологического материала бактериоскопическим и молекулярно-генетическим методами

Название районов	Количество исследованных проб	Выявлено бруцелл при микроскопическом исследовании окрашенных мазков по:				Исследовано по ПЦР	
		методу Шуляка-	%	методу Козловского	%	положительно реагировало	%
Хатлонская область							
Яван	3	0	0	0	0	3	100
Дж. Балхи	4	0	0	2	50	4	100
Джиликул	4	1	25	2	50	4	100
Шахритуз	5	2	40	3	60	5	100
Муминабад	1	0	0	0	0	0	0
Васе	1	0	0	0	0	0	0
Всего:	18	3	16,7	7	38,9	16	88,9
Районы республиканского подчинения (РРП)							
Рудаки	1	0	0	0	0	0	0
Гиссар	2	0	0	0	0	0	0
Турсунзаде	3	1	33,3	1	33,3	3	100
Файзабад	4	2	50	2	50	2	50
Вахдат	3	2	66,7	2	66,7	3	100
Файзабад	2	2	100	2	100	2	100
Всего:	15	7	46,7	7	46,7	10	66,7
Итого	33	10	30,30	14	42,42	26	78,78

следовании и 1,5 раза больше, чем при бактериологическом исследовании. При этом исследование патологического материала в ПЦР занимает ориентировочно 8 часов времени, тогда как для бактериологического исследования необходимо более 1 месяца.

Заключение

Результаты выполненных исследований показали, что ПЦР является более чувствительным методом для выявления бруцеллеза по сравнению с бактериологическим и бактериоскопическим методом исследования. Высокая чувствительность и специфичность ПЦР обеспечивает возможность верификации диагноза на всем протяжении инфекционного процесса (в острой, подострой и хронической стадиях болезни) и выявляет активность инфекционного процесса у животных с хроническим течением бруцеллеза при больших сроках давности. Высокая диагностическая эффективность и универсальность использования ПЦР для лабораторной диагностики бруцеллеза мелкого рогатого скота, может найти применение в качестве дополнительного метода исследования в сложных диагностических случаях.

Литература

1. Анализ эпизоотологической ситуации по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота в России. Искандаров М.И., Федоров А.И., Альбертян М.П. и др. Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. -2006. - № 4. -С. 4-5.
2. Практическое пособие по мониторингу бруцеллеза, туберкулеза, паратуберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота: организационно-хозяйственные, ветеринарно-санитарные и зооигиенические аспекты профилактики и ликвидации этих инфекций. Гулюкин М.И., Найманов А.Х., Альбертян М.П., др. Москва, 2014.
3. Brucellosis vaccines: past, present and future. Albertian M.P., Fedorov A.I., Iskandarov M.I. Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2006. № 4. С. 8-11.
4. Искандаров М.И., Федоров А.И., Альбертян М.П. Диагностика бруцеллеза. Животноводство России. -2007. -№ 5.- С. 59-60.
5. Искандаров М.И. Бруцеллез животных в России: Эпизоотологические особенности и совершенствование специфической профилактики. Дисс. док. вет. наук. М.- 2011.- 386 с.

Таблица 2. Результаты исследования патологического материала бактериологическим и молекулярно-генетическим (ПЦР) методами

Наименование районов	Микроскопическое исследование и РА выросших культур			Исследовано в ПЦР после посева			
	исследовано проб	выявлено	%	выявлено всего	%	выявлено дополнительно	%
Хатлонская область							
Яван	3	1	33,3	3	100	2	66,7
Дж. Балхи	4	3	75,0	4	100	1	25,0
Джиликул	4	4	100	4	100	0	0
Шахритуз	5	3	60,0	5	100	2	40,0
Муминабад	1	0	0	0	0	0	0
Васе	1	0	0	0	0	0	0
Всего:	18	11	61,1	16	88,9	5	27,8
Районы республиканского подчинения							
Рудаки	1	0	0	0	0	0	0
Гиссар	2	0	0	0	0	0	0
Турсунзаде	3	1	33,3	3	100	2	66,7
Файзабад	4	2	50,0	2	50	0	0
Вахдат	3	2	66,7	3	100	1	33,3
Файзабад	2	2	100	2	100	0	0
Всего:	15	7	46,7	10	66,66	3	20,0
Итого	33	18	54,5	26	78,8	8	24,2