

SUMMARY

Aiming at identification of tissue and species origin of mammalian cell lines collected at Ivanovsky Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, we analyzed 31 cell lines initially isolated in the institute or donated by collaborators. The species-specific polymerase chain reaction and direct sequencing of mitochondrial DNA demonstrated that in 5 cases the species origin of the cell line has been misinterpreted. The detailed protocols of the techniques used for DNA-based species identification are presented.

Литература

1. Новохатский, А.С., Михайлова, Г.Р. и Царева, А.А. (1976) 'Проблема контаминации клетками и новые подходы к контролю перевиваемых линий', *Вопросы вирусологии*, С. 396-408.
2. Новохатский, А.С., Царева, А.А., Михайлова, Г.Р. и Жданов, В.М. (1979) 'Контаминация клеток перевиваемых линий', *Вопросы вирусологии*, С. 432-439.
3. Царева, А.А., Колокольцова, Т.Д., Немцов, Ю.В., Исаенко, А.А. и Бочкова, Т.Г. (1986) 'Идентификация линий клеток насекомых', *Вопросы вирусологии*, С. 87-95.
4. Armstrong, K.F. and Ball, S.L. (2005) 'DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 360, No. 1462, С. 1813-1823.
5. Buehring, G.C., Eby, E.A. and Eby, M.J. (2004) 'Cell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it?', *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, Vol. 40, No. 7, pp. 211-5.
6. Gartler, S.M. (1968) 'Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines', *Nature*, Vol. 217, No. 5130, pp. 750-1.
7. Gilbert, D.A., Reid, Y.A., Gail, M.H., Pee, D. White, C., Hay, R.J. and O'Brien, S.J. (1990) 'Application of DNA fingerprints for cell-line individualization', *Am J Hum Genet*, Vol. 47, No. 3, pp. 499-514.
8. Hebert, P.D. and Gregory, T.R. (2005) 'The promise of DNA barcoding for taxonomy', *Syst Biol*, Vol. 54, No. 5, pp. 852-9.
9. Irwin, D.M., Kocher, T.D. and Wilson, A.C. (1991) 'Evolution of the cytochrome b gene of mammals', *J Mol Evol*, Vol. 32, No. 2, pp. 128-44.
10. Kaplan, J. and Hukku, B. (1998) 'Cell line characterization and authentication', *Methods Cell Biol*, Vol. 57, pp. 203-16.
11. Natalia V. Ivanova (2007) 'Universal primer cocktails for fish DNA barcoding', *Molecular Ecology Notes*, Vol. 7, No. 4, pp. 544-548.
12. Ratnasingham, S. and Hebert, P.D.N. (2007) 'The Barcode of Life Data System (http://www.barcodinglife.org)', Vol. - 7, pp. - 364.
13. Saitou, N. and Nei, M. (1987) 'The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees', *Mol Biol Evol*, Vol. 4, No. 4, pp. 406-25.
14. Simpson, W.F. and Stulberg, C.S. (1963) 'Species Identification of Animal Cell Strains by Immunofluorescence', *Nature*, Vol. 199, pp. 616-7.
15. Stulberg, C.S., Simpson, W.F. and Berman, L. (1961) 'Species-related antigens of mammalian cell strains as determined by immunofluorescence', *Proc Soc Exp Biol Med*, Vol. 108, pp. 434-9.
16. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) 'MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0', *Mol Biol Evol*, Vol. 24, No. 8, pp. 1596-9.

УДК: 619:616.98:579.873.21:636

А.Х.Найманов, М.С.Калмыкова, Е.П.Осипова

(ГНУ ВНИИЭВ, г.Москва, Россия, ФГОУ ВПО МГАВМиБ, г.Москва, Россия)

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПЦР НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ БОРЬБЫ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Среди инфекционных болезней животных туберкулез крупного рогатого скота занимает особое место. Туберкулез своеобразен тем, что долгие годы может протекать в латентной форме, не проявляя клинических признаков, не влияя на продуктивность и жизнедеятельность животных. Туберкулез легко и быстро распространяется среди поголовья крупного рогатого скота, но искореняется с большим трудом. Резервуар инфекции так разнообразен и обширен, что мероприятия по борьбе с туберкулезом крупного рогатого скота не могут ограничиться только этим видом животных, а должны охватить все окружающее живое.

Против туберкулеза нет достаточно эффективных средств лечения и специфической профилактики. Поэтому, основным звеном в проведении профилактических и оздоровительных мероприятий является своевременное и точное выявление и убой больных туберкулезом животных.

Основным методом прижизненной диагностики крупного рогатого скота является внутрикожная проба с ППД туберкулином для млекопитающих. Внутрикожная туберкулиновая проба также обладает определенными недостатками: выявление неспецифических реакций у здоровых животных и недоявление больных туберкулезом животных в неблагополучных

стадах.

В связи с указанными проблемами диагностика туберкулеза крупного рогатого скота должна быть комплексной, с применением различных дополнительных методов диагностики.

Достижения в области молекулярной биологии привели к разработке новых подходов к обнаружению возбудителя в диагностическом материале. На протяжении последних лет широко используются молекулярные технологии, основанные на изучении генетического материала микроорганизма на уровне хромосомной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР).

В доступной литературе имеются сообщения об успешном применении ПЦР при диагностике многих инфекционных болезней, в том числе и по изучению возможности применения ПЦР при диагностике туберкулеза животных (И.Л. Обухов с соавт., 1995, 1997, 2004; И.П. Суханов, 1999; А.Н. Шаров, 1998, 2000, 2003; Т.В. Гребенникова с соавт., 1999, 2004; И.В. Ефимычев, 2002; Б.И. Антонов, 2002; И.Н. Корнева, 2004; А.Х. Найманов с соавт., 2004; Е.П. Осипова, 2004; Т.А. Борисова с соавт., 2004; Т.И. Алипер с соавт., 2006; М.С. Калмыкова с соавт., 2007, 2008).

В последние годы в ветеринарную лабораторную практику все активнее внедряется гибридационно-флуоресцентный метод детекции продуктов ПЦР, получивший название «Real-time PCR». Модифицированный метод, в отличие от классической ПЦР, имеет ряд преимуществ:

количественное определение ДНК/РНК инфекционных агентов в исследуемом материале;

определение двух и более видов возбудителя в ходе одной реакции;

более высокая чувствительность;

автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов;

отсутствие стадии электрофореза;

менее строгие требования к организации ПЦР-лаборатории.

Отсутствие стадии электрофореза позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и, таким образом, уменьшить число ложно-положительных результатов.

Однако до настоящего времени единого мнения о диагностической значимости метода ПЦР при диагностике туберкулеза животных не имеется, и этот метод не нашел широкого применения в ве-

теринарной практике нашей страны и за рубежом.

Поэтому, учитывая недостаточную изученность некоторых важных вопросов диагностики, длительность, трудоемкость и сравнительно низкую эффективность классических методов прижизненной и лабораторной диагностики этой хронической инфекции, дальнейшее совершенствование и изучение возможности применения различных модификаций ПЦР при диагностике туберкулеза у крупного рогатого скота является своевременным и актуальным.

Целью нашей работы было изучение диагностической ценности коммерческих тест-систем для диагностики туберкулеза животных методом ПЦР, используемых в ветеринарных лабораториях Российской Федерации.

Материалы и методы

Работа выполнена в лаборатории микобактериозов ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ), на опытной базе о. Лисий Вышневолоцкого отдела ВИЭВ, ФГУ Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория (ЦНМВЛ), учебно-методическом центре НПЦ «Диагностика генно-инженерными системами».

Для ПЦР-исследований использовали тест-системы: «МТБ-КОМ» и «МТБ-КОМ-FRT» производства ФГУ ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦНИИЭ), «Тест-система для выявления и дифференциации возбудителей туберкулеза *M. bovis* и *M. tuberculosis*» производства НПО НАРВАК (НАРВАК), «ДиаГен-Мycobacteria» производства ЗАО ЛАГИС (ЛАГИС), «GenePak DNA PCR test Mtu+bo» производства ООО Компания БИОКОМ (БИОКОМ), «Тест-система для выявления и дифференциации возбудителей туберкулеза *M. bovis* и *M. tuberculosis*» производства Института молекулярной генетики РАН (ИМГ).

Выделение ДНК, постановку ПЦР и учет результатов методом горизонтального электрофореза проводили в соответствии с наставлениями по применению тест-систем.

Постановку ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» проводили на приборе RotorGene-6000 производства «CorbettResearch» (Австралия). Полученные в ходе экспериментов данные анали-

зировали с помощью программного обеспечения «RotorGene 6.0». Результаты реакции интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (Treshhold) в виде графика зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов. Это соответствовало наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов.

Для определения специфичности тест-систем использовали 62 музейные культуры микобактерий: 10 культур *M.tuberculosis*, 22 культуры *M.bovis*, 10 культур *M.avium*, 20 культур разных видов нетуберкулезных микобактерий.

От крупного рогатого скота исследовали кровь (15 проб), носовую слизь (15 проб), мочу (15 проб), фекалии (15 проб), кусочки паренхиматозных органов и лимфатические узлы (15 проб в трех повторях).

От лабораторных животных (30 морских свинок, 30 кроликов и 24 кур) исследовали кусочки паренхиматозных органов (84 пробы в трех повторях от морских свинок, 84 пробы в трех повторях от кроликов и 24 пробы в трех повторях от кур).

Исследовано 135 смывов со стен боксов, где содержались экспериментально зараженные разными видами микобактерий козы, 135 смывов со стенок поилок и 135 проб воды из поилок.

Результаты исследований

Изучение диагностической ценности ПЦР-тест-систем разных производителей.

В качестве положительного биоматериала использовалась кровь крупного рогатого скота, содержащая культуру *M.bovis* (штамм VCG) в концентрации - от 70 млн. до 10 клеток *M.bovis* (штамм VCG) в 0,1 мл крови. В качестве отрицательного (контрольного) материала использовали кровь здорового крупного рогатого скота из благополучного по туберкулезу хозяйства.

Установлено, что все три комплексные ПЦР-тест-системы имеют одинаковую чувствительность – 10 клеток возбудителя в пробе (минимально взятая концентрация), а из дифференцирующих тест-систем большей чувствительностью обладает тест-система НАРВАК. Тест-система ИМГ имеет более низкую чувствительность - 1000 клеток возбудителя в 0,1 мл пробы, что при низкой бактериальной на-

грузке пробы может быть причиной получения ложноотрицательных результатов. При исследовании не содержащей культуры *M.bovis* (штамм VCG) пробы крови пятью тест-системами во всех случаях получены отрицательные результаты.

Результаты исследований свидетельствуют, что комплексные тест-системы для диагностики туберкулеза методом ПЦР имеют одинаковую чувствительность – 10 клеток возбудителя в 0,1 мл пробы (минимально взятая концентрация) и могут быть использованы для скрининга.

В случаях необходимости одновременного выявления и дифференциации возбудителей туберкулеза предпочтение следует отдавать тест-системе НАРВАК. Так, эта тест-система обладает такой же чувствительностью, как другие комплексные тест-системы, но позволяет выявлять ДНК возбудителей туберкулеза и одновременно проводить их дифференциацию.

Изучение специфичности разных тест-систем провели на 62 культурах микобактерий: 10 - *M.tuberculosis*, 22 - *M.bovis*, 10 - *M.avium* и 20 культурах разных видов нетуберкулезных микобактерий.

Результаты исследования показали, что все испытанные тест-системы обладают разной специфичностью. При исследовании разных культур процент специфичности варьировал от 70% (тест-система БИОКОМ) до 100% (тест-системы ЦНИИЭ, НАРВАК и ИМГ). Так, при исследовании культуры *M.tuberculosis* специфичность всех тест-систем составила 100%, при исследовании *M.bovis* специфичность тест-систем ЦНИИЭ, НАРВАК, ИМГ, ЛАГИС также составила 100%. С тест-системой БИОКОМ ложноотрицательные результаты получены в четырех случаях из 22, то есть специфичность составила 81,8%.

При исследовании культуры *M.avium* специфичность тест-систем ЦНИИЭ, НАРВАК, ИМГ составила 100%, тест-системы ЛАГИС – 90%, БИОКОМ – 70%.

При исследовании других культур микобактерий специфичность тест-систем ЦНИИЭ, НАРВАК и ИМГ составила 100%, тест-системы БИОКОМ – 85%, ЛАГИС – 95%.

Таким образом, при исследовании различных культур микобактерий тест-системами ЦНИИЭ, НАРВАК и ИМГ испытанные культуры были правильно идентифицированы в 100% случаев. При исследовании культур тест-системой ЛАГИС культуры были правильно идентифициро-

ваны в 96,3%, БИОКОМ в 84,2% случаях.

В результате проведенных исследований установлено преимущество тест-системы ЦНИИЭ перед остальными комплексными тест-системами. Установленное преимущество тест-системы ЦНИИЭ можно объяснить: наличием внутреннего контроля, который позволяет контролировать этапы выделения ДНК и прохождения ПЦР в каждой пробирке, а также отсутствие ингибиторов, снижающих эффективность ПЦР, что в итоге уменьшает вероятность появления ложноотрицательных результатов; наличием отрицательного и положительного контролей выделения ДНК, что позволяет дополнительно контролировать этап выделения ДНК; чувствительностью и специфичностью тест-системы, что позволяет в 100% случаев дифференцировать микобактерии туберкулезного комплекса от различных видов нетуберкулезных микобактерий; возможностью выявления ДНК *M. tuberculosis complex*, включающего, помимо *M. tuberculosis* и *M. bovis*, еще *M. bovis* (BCG), *M. africanum*, *M. microti*.

Дифференцирующие тест-системы НАРВАК и ИМГ обладали 100% специфичностью, но разной чувствительностью. Так, чувствительность тест-системы НАРВАК составила 10 клеток возбудителя в 0,1 мл пробы, а тест-системы ИМГ – 1000 клеток возбудителя в 0,1 мл пробы. Поэтому, для одновременного выявления и дифференциации возбудителей туберкулеза в дальнейших исследованиях мы отдали предпочтение тест-системе НАРВАК. Однако технология «nested PCR», используемая в тест-системе НАРВАК требует более строгого соблюдения режима работы по причине риска контаминации из-за постановки двух раундов ПЦР, что увеличивает вероятность получения ложноположительных результатов и снижает возможности применения ПЦР в практических условиях.

Изучение диагностической ценности ПЦР для дифференциации неспецифических реакций у крупного рогатого скота.

Изучение диагностической ценности ПЦР-тест-систем четырех производителей провели на 15 реагирующих на туберкулин коровах из благополучных по туберкулезу хозяйств, где установлена сенсibilизация животных атипичными микобактериями.

С диагностической целью было убито 15 коров, реагирующих с большей или

равной реакцией на ППД-туберкулин для млекопитающих и КАМ.

При убое реагирующих коров характерных для туберкулеза изменений не обнаружено ни в одном случае. При лабораторном исследовании (культуральном и биологическом) патматериала от убитых животных возбудитель туберкулеза не выделен.

ПЦР-исследованием проб крови тест-системами ЦНИИЭ, НАРВАК и БИОКОМ во всех случаях получены отрицательные результаты; тест-системой ЛАГИС из крови двух животных (13,3%) выделена ДНК возбудителя туберкулеза.

ПЦР-исследованием носовой слизи, мочи и фекалий в 6,7-13,3% случаев получены положительные результаты при использовании тест-систем всех производителей.

При исследовании послеубойного патматериала тест-системами ЦНИИЭ, НАРВАК и ЛАГИС во всех случаях получены отрицательные результаты. При исследовании послеубойного патматериала тест-системой БИОКОМ получено 5 (33,3%) положительных результатов.

Анализ результатов исследований показывает, что наибольшее количество положительных результатов ПЦР было получено при использовании тест-системы БИОКОМ – 8; ЛАГИС – 4, ЦНИИЭ – 3, НАРВАК – 3.

Таким образом, при исследовании проб крови, носовой слизи, мочи, фекалий и патматериала от реагирующих на туберкулин и убитых с диагностической целью животных, тест-системы ЦНИИЭ, ЛАГИС, БИОКОМ и НАРВАК дают единичные положительные результаты.

Этот же материал был исследован тест-системой «МТБ-КОМ-FRT». Во всех случаях получены отрицательные результаты.

Полученные результаты ПЦР-исследований доказывают, что гибридационно-флуоресцентная детекция в режиме «реального времени» является более совершенной и специфичной при исследовании биоматериала от крупного рогатого скота.

Изучение диагностической ценности ПЦР на экспериментально зараженных морских свинках, кроликах и курах.

Установлено, что заражение морских свинок и кроликов культурой *M. bovis* в 100% случаев вызывает у них генерализованный процесс туберкулеза. Метод ПЦР в зависимости от применяемой тест-системы позволяет выявить и дифферен-

цировать ДНК *M. bovis* с эффективностью от 83,3 до 100%.

Заражение морских свинок и кроликов культурой *M. tuberculosis* вызывает в 100% случаев генерализованный процесс у морских свинок, у кроликов – единичные туберкулезные поражения в виде отдельных небольших узелков. Метод ПЦР в зависимости от применяемой тест-системы позволяет выявить и дифференцировать ДНК *M. tuberculosis* с эффективностью от 83,3 до 100%.

Заражение морских свинок культурой *M. avium* не вызывает у них туберкулезных поражений, у кроликов вызывает сепсис, характеризующийся резким увеличением селезенки, у кур вызывает характерные для туберкулеза изменения в легких, печени и селезенке в виде множественных мелких туберкулезных гранулем. Метод ПЦР выявил ДНК *M. avium* из патматериала от одного кролика из трех и от двух кур из трех.

Заражение морских свинок, кроликов и кур культурами нетуберкулезных микобактерий не вызывает у них характерных для туберкулеза патологоанатомических изменений.

ПЦР-исследованием патматериала от трех морских свинок, трех кроликов и трех кур контрольной группы во всех случаях всеми тест-системами получены отрицательные результаты.

На основании полученных результатов исследований можно сделать заключение, что результаты ПЦР-исследования патологического материала от зараженных разными культурами микобактерий морских свинок, кроликов и кур коррелируют с результатами биологического исследования.

Исследование ПЦР-тест-системами различных производителей объектов внешней среды.

В качестве объектов внешней среды исследовали смывы со стен боксов, смывы со стенок поилок и воду из поилок, отобранных в течение всего эксперимента из боксов, в которых содержали зараженных разными видами микобактерий животных.

Объекты внешней среды из боксов исследовали до заражения, через 21, 55, 103, 134, 164, 218, 266, 296 дней после заражения, а также после убоя зараженных животных и проведения дезинфекции тест-системами для ПЦР-диагностики туберкулеза ЦНИИЭ, НАРВАК, ЛАГИС и БИОКОМ.

В начале эксперимента и на протяже-

нии восьми месяцев после заражения результаты ПЦР-исследования объектов внешней среды тест-системами четырех производителей были отрицательные, т.е. ДНК возбудителей туберкулеза не выделили.

В дальнейшем, через 266 и 296 дней после заражения, по-видимому, по мере выделения возбудителей туберкулеза зараженными животными, обсеменения объектов внешней среды и накопления возбудителей туберкулеза в исследованных объектах, были получены положительные результаты ПЦР при исследовании смывов со стенок поилок и воды из поилок.

Так, установлено, что в боксах, где содержались животные, зараженные *M. bovis* и *M. tuberculosis*, ДНК *M. bovis* и *M. tuberculosis* обнаружили в смывах из поилок и воды при исследовании тест-системами четырех производителей. Из смывов со стен боксов ДНК возбудителей туберкулеза не обнаружили ни в одном случае.

При исследовании объектов внешней среды бокса, где содержались животные, зараженные *M. avium*, не получено ни одного положительного результата.

При исследовании объектов внешней среды бокса, где содержались животные контрольной группы, тест-системами ЦНИИЭ, НАРВАК и БИОКОМ не было выделено ДНК возбудителей туберкулеза; тест-системой ЛАГИС из воды и из смыва с поилки были получены однократные положительные результаты.

Полученные результаты доказывают, что выделение возбудителей туберкулеза и их концентрация на объектах внешней среды зависит от степени заражения туберкулезом экспериментально зараженных животных и от вида объекта внешней среды. По-видимому, на стенках поилок и в воде оседает и накапливается значительное количество микобактерий, выделенных из организма зараженных туберкулезом животных.

После убоя экспериментально зараженных животных и дезинфекции боксов, ПЦР-исследованием объектов внешней среды положительных результатов не получено.

Таким образом, можно сделать заключение, что экспериментально зараженные *M. bovis* и *M. tuberculosis* животные выделяют возбудителей туберкулеза во внешнюю среду, что позволяет выявлять ДНК *M. bovis* и *M. tuberculosis* из смывов со стенок поилок и из воды.

Резюмируя проведенные исследова-

ния по изучению диагностической ценности ПЦР, считаем необходимым указать, что методом ПЦР выявляют только ДНК возбудителя туберкулеза. В соответствии утвержденных нормативных документов: «Санитарных и ветеринарных правил» от 1996 г., «Наставления по диагностике туберкулеза животных» от 2002 г. заболевание крупного рогатого скота туберкулезом считается установленным, если диагноз подтверждается данными патологоанатомического вскрытия, а при отсутствии характерных для туберкулеза изменений – положительными результатами бактериологического исследования (биопроба на морских свинках) и при обнаружении характерных для туберкулеза изменений у лабораторных животных.

Следует особо отметить, что при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота выделение возбудителя туберкулеза, тем более его ДНК, не может являться основанием для установления диагноза, т.к. даже при выделении возбудителя необходимо доказать его патогенность для чувствительных к заражению туберкулезом лабораторных животных (из-за возможного наличия L-форм *M.bovis* и *M.tuberculosis*).

Поэтому, на современном этапе борьбы с туберкулезом, диагностика туберкулеза крупного рогатого скота должна быть комплексной, а метод ПЦР может использоваться как дополнительный лабораторный экспресс-метод.

Выводы

1. Тест-системы ЦНИИЭ, НАРВАК, ЛАГИС и БИОКОМ имеют одинаковую чувствительность – 10 клеток *M.bovis* в 0,1 мл пробы (минимально взятая концентрация), тест-система производства ИМГ имеет более низкую чувствительность – 1000 клеток *M.bovis* в 0,1 мл пробы.

2. Специфичность тест-систем ЦНИИЭ, НАРВАК и ИМГ составляет 100% к микобактериям туберкулезного комплекса и микобактериям *M.avium*, *M.paratuberculosis*, *M.phlei*, *M.smegmatis*, *M.fortuitum*, *M.xenopus*.

Специфичность тест-системы ЛАГИС к микобактериям туберкулезного комплекса составляет 100%, к *M.avium* – 90%, к

микобактериям *M.paratuberculosis*, *M.phlei*, *M.smegmatis*, *M.fortuitum*, *M.xenopus* – 95%.

Специфичность тест-системы БИОКОМ к *M.tuberculosis* составляет 100%, к *M.bovis* – 81,8%, к *M.avium* – 70%, к микобактериям *M.paratuberculosis*, *M.phlei*, *M.smegmatis*, *M.fortuitum*, *M.xenopus* – 85%.

3. При ПЦР-исследовании биоматериалов от реагирующего крупного рогатого скота с неспецифическими реакциями в зависимости от используемой тест-системы выявлены ложноположительные результаты от 6,7 до 33,3%..

4. Применение ПЦР для послеубойной диагностики туберкулеза экспериментально зараженных *M.bovis*, *M.tuberculosis* и *M.avium* животных позволяет обнаружить ДНК возбудителя туберкулеза в патологическом материале при наличии или отсутствии видимых патологоанатомических и патоморфологических изменений.

5. Тест-система «МТБ-КОМ-FRT» ЦНИИЭ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» обладает более высокой чувствительностью и специфичностью, чем тест-системы с детекцией методом электрофореза.

6. Экспериментально зараженные разными видами микобактерий животные выделяют возбудителя туберкулеза во внешнюю среду, что подтверждается положительными результатами ПЦР-исследования различных объектов внешней среды, отобранных из боксов с зараженными животными.

Заключение

При лабораторной диагностике туберкулеза крупного рогатого скота метод ПЦР следует использовать в целях идентификации и дифференциации *M.bovis* и *M.tuberculosis* от других видов нетуберкулезных микобактерий.

Метод ПЦР может быть использован как дополнительный экспресс-метод при исследовании патматериала от убитых с диагностической целью животных.

При оздоровлении неблагополучных по туберкулезу хозяйств метод ПЦР можно использовать для проверки контроля качества проведенной дезинфекции животноводческих помещений и объектов внешней среды на наличие ДНК возбудителей туберкулеза.

SUMMARY

TB has a special place among the infectious diseases of cattle. Diagnosis of tuberculosis is complex with the use of different methods. The purpose of the work - to study the diagnostic value of commercial test kits for PCR-diagnosis of TB animals. As a result of the studies found that the commercial test-systems have the same sensibility - *M.bovis* 10 cells in 0.1 ml of the sample, but different specificity. Real-time PCR has high sensitivity and specificity and is preferable for PCR diagnosis of tuberculosis of cattle.

Литература

- Алипер, Т.И. ПЦР в реальном времени для диагностики туберкулеза / Алипер Т.И., Потапова Н.И., Непоклонов Е.А., Забережный А.Д., Гребенникова Т.В. // Ветеринарная жизнь. -2006. - №7-8. - С.13.
- Антонов, Б.И. Использование метода ПЦР при диагностике острых инфекционных болезней животных / Антонов Б.И. // Медицинский центр «Наследственность». - Н.Новгород. - 2002.
- Борисова, Т.А. Полимеразная цепная реакция для индикации микобактерий с использованием различных тест-систем в животноводческих хозяйствах республики Татарстан / Борисова Т.А., Хазипов Н.З., Иванов А.В., Хамзин Р.А., Королева Л.В. // Генодиагностика инфекционных болезней // Всерос. гос. центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов. – Москва, 2004. - С.205-208.
- Гребенникова, Т.В. Дифференциальная диагностика микобактерий методом полимеразной цепной реакции / Гребенникова Т.В., Грабовецкий В.В., Кальнов С.Л., Непоклонов Е.А., Шумский Я.И. // Ветеринария. -1999. -№3. - С.17-20.
- Гребенникова, Т.В. Молекулярные методы исследования в диагностике туберкулеза / Гребенникова Т.В., Кальнов С.Л., Забережный А.Д., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А. // Ветеринарная патология. - 2004. - №1-2. - С.92-93.
- Калмыкова М.С. Диагностическая ценность ПЦР-тест-систем при туберкулезе животных / Калмыкова М.С., Найманов А.Х. // Материалы международной научно-практической конференции к 110-летию ВИЭВ.-Москва, 2008.-С.142-158.
- Корнева, И.Н. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота с применением полимеразной цепной реакции / Корнева И.Н., Осипова Е.П., Найманов А.Х. // Генодиагностика инфекционных заболеваний: Сб.тезисов / 4-ая Всерос. научно-практ.конф. - Москва, 2002. - С.343-344.
- Найманов, А.Х. Полимеразная цепная реакция (система sepX3-regX3) при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота / Найманов А.Х., Овдиенко Н.П., Осипова Е.П., Солодова И.В., Суворов В.С. // Ветеринарная патология. - 2004. - №1-2. -С.96-99.
- Найманов, А.Х. ПЦР при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота / Найманов А.Х., Овдиенко Н.П., Осипова Е.П., Солодова И.В., Суворов В.С., Корнева И.Н., Демкин В.В. // Ветеринария. -2004.- С.19-23.
- Обухов, И.Л. Лабораторная диагностика инфекционных болезней методом ДНК-амплификации при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) / Обухов И.Л., Груздев К.Н. // Сб.науч.трудов / ВГНКИ. – Москва, 1995 (1996).- Т.57. -С.36-45.
- Обухов, И.Л. Использование полимеразной цепной реакции в практических ветеринарных лабораториях / Обухов И.Л., Груздев К.Н., Панин А.Н. // Ветеринария. -1997.- №2. -С.24-27
- Обухов, И.Л. Усовершенствование коммерческих ПЦР-тест-систем для диагностики туберкулеза животных / Обухов И.Л., Букова Н.К., Клименкова О.В. // Ветеринарная патология. -2004. - №1-2. - С.94.
- Осипова, Е.П. Применение полимеразной цепной реакции для идентификации микобактерий и ее диагностическая значимость при туберкулезе крупного рогатого скота: Автореф. дисс..... канд. биол. наук: 16.00.03 / Е.П. Осипова; ВИЭВ.- Москва, 2004. - 21 с .
- Шаров, А.Н. Тест-системы ПЦР при туберкулезе / Шаров А.Н., Седов В.А. // Ветеринария. -1998. -№3. - С.20-22.
- Шаров, А.Н. ПЦР при диагностике туберкулеза / Шаров А.Н., Ерошенко Л.А., Суханов И.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Грабовецкий В.В. // Ветеринария. - 2000. - №10. - С. 19-22.

УДК: 619:616.98:579.873.21:636.22/28

А.Х.Найманов

(ВИЭВ, г. Москва, Россия)

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ОЗДОРОВИТЕЛЬНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

В связи с тем, что туберкулез крупного рогатого скота наносит значительный экономический ущерб неблагополучным хозяйствам, владельцам животных и представляет большую опасность в заражении людей, организация мероприятий по борьбе с этой инфекцией была и остается актуальной проблемой.

Необходимость организации и проведения обязательных противотуберкулезных мероприятий обусловлена особой опасностью заражения животных и людей этой старой, но непобежденной хронической инфекцией всех видов животных и

людей. Так, еще в 1937 г. П.П.Вишневский указывал, что туберкулез занимает особое место среди других болезней животных. Туберкулез своеобразен тем, что долгие годы может протекать в скрытой форме, без клинических признаков болезни, не влияя на продуктивность и жизнедеятельность животных. Туберкулез легко и быстро распространяется среди поголовья крупного рогатого скота, но искореняется с большим трудом. В неблагополучных хозяйствах достаточно остаться не выявленным одному больному животному, чтобы свести к нулю долгие усилия по борь-