

ватных форм стереотипного (общевидового, породного или благоприобретенного индивидуального) поведения — все виды трусливой агрессии, избегания и прочее. Сложность анализа компенсаторного поведения состоит в том, что при этой форме невроза обязательно присутствует объект поведения, а следовательно, его трудно отграничить от сознательно принимаемого обоснованного решения и консуматорного поведения в целом. В качестве основ-

ного диагностического признака для этого случая мы принимаем повторяемость и общность ситуаций, в которых возникает такое поведение.

Проведенная нами работа свидетельствует о не разработанности темы. Учитывая возрастающий интерес к коррекции проблемного поведения свиней, а также диагностики и лечения неврозов, можно предположить, что это направление окажется весьма перспективным.

М.С. Калмыкова, Е.П. Осипова, Н.Г. Толстенко, В.И. Строгонов
(ГНУ ВИЭВ)

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА КОЗ

В общей системе мер борьбы с туберкулезом животных наиболее важным звеном является своевременная и достоверная диагностика болезни (А.Х. Найманов, Н.П. Овдиенко, 2002). Основа прижизненной диагностики туберкулеза - внутрикожная туберкулиновая проба с применением ППД-туберкулина для млекопитающих. Для послеубойной диагностики используют патологоанатомический метод и бактериологическое исследование.

Бактериологическая диагностика туберкулеза отличается длительностью, трудоемкостью и относительно низкой эффективностью. Исследования на туберкулез проводят в сроки до трех месяцев, в некоторых случаях — до полугода и более. (Н.А. Донченко и соавт., 2004).

В последние годы широкое распространение получили методы диагностики инфекционных болезней на основе выявления специфической ДНК или РНК возбудителя методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). А.Н. Шаров (1999, 2003), А.Х. Найманов и соавт. (2004), Т.В. Гребенникова и соавт. (2004), Kearns A.M. et al. (1999), Romero R.E. et al. (1999) и другие считают эту реакцию строго специфичной, высоко чувствительной. Применение ПЦР позволяет обнаруживать микроорганизмы, имеющиеся в исследуемом материале в очень малом количестве.

По данным А.Х. Найманова и соавт. (2004) ПЦР-метод может быть использован при послеубойной лабораторной диагностике туберкулеза крупного рогатого скота, как дополнительный экспресс-метод при исследовании патматериала от

убитых с диагностической целью животных, а также для идентификации и дифференциации *M. bovis* от *M. tuberculosis* и от других видов микобактерий.

Однако до сих пор отсутствует единое мнение об эффективности ПЦР при диагностике туберкулеза животных.

Целью данной работы было определение возможности применения полимеразной цепной реакции для диагностики туберкулеза у коз, экспериментально зараженных *M. bovis*.

Одной из задач являлся выбор материала и методов пробоподготовки для ПЦР-исследования.

Материалы и методы

Трех коз заразили орально первоначально взвесью патологического материала от павших с генерализованной формой туберкулеза морских свинок (селезенка, печень) и кроликов (селезенка, печень). Морские свинки и кролики были заражены патологическим материалом убитой коровы из неблагополучного по туберкулезу хозяйства «С». У коровы были обнаружены патологические изменения, свойственные туберкулезу.

Каждой козе вводили через зонд суспензию печени и селезенки от одной морской свинки и одного кролика, а через 18 дней культуру *M. bovis*, выделенную от этой же убитой коровы, в дозе 1 мг на 1 кг живой массы животного. Животных содержали в течение 9 мес. Одна коза пала через месяц, две другие были убиты.

Нами исследован следующий прижизненный материал: кровь, носовая слизь, фекалии. Материал отбирали ежемесячно.

Транспортировку материала в лабораторию осуществляли в термоконтейнере.

Кровь брали одноразовыми закрытыми системами для взятия крови «S-Monovette» с антикоагулянтом ЭДТА для получения стабилизированной крови (Sarstedt AG.&Co., Германия). Для ПЦР-исследования использовали цельную кровь в количестве 100 мкл.

Носовую слизь отбирали стерильными ватными тампонами, помещали в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл со стерильным физиологическим раствором, тампон отжимали и удаляли. Суспензию центрифугировали 10 минут при 10000 об/мин, для выделения ДНК использовали осадок.

Фекалии отбирали в одноразовые стерильные флаконы. Пробоподготовку проводили двумя методами:

- готовили 10%-ную суспензию на стерильном физиологическом растворе, центрифугировали 15 минут при 3000 об/мин и для выделения ДНК использовали супернатант;

- после центрифугирования (3000 об/мин 15 минут) отбирали супернатант в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и дополнительно центрифугировали 10 минут при 10000 об/мин. Супернатант удаляли, в пробирке оставляли около 500 мкл осадка, который ресуспендировали и еще раз центрифугировали при 3000 об/мин 10 минут; для выделения ДНК использовали супернатант.

Для исследования методом ПЦР нами была выбрана тест-система «МТБ-КОМ» производства ЦНИИЭ, поскольку в отличие от других тест-систем в ее состав входит внутренний контроль, позволяющий контролировать процесс выделения ДНК в каждой пробирке, тем самым исключая ложноотрицательные результаты.

Выделение ДНК, амплификацию и детекцию продуктов амплификации проводили в соответствии с наставлением к тест-системе.

Для исследования патологического материала методом ПЦР готовили общую пробу из суспензии лимфатических узлов и паренхиматозных органов на стерильном физиологическом растворе, центрифугировали 15 минут при 3000 об/мин., затем из каждого флакона супернатант отбирали в три пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл, центрифугировали 20 минут при 10000 об/мин., для выделения ДНК использовали осадок. Выделение ДНК и постановку амплификации проводили в трех повто-

рах. Одновременно проводили посев образцованного материала на среду ФАСТ-3Л.

Результаты исследований

При исследовании методом ПЦР отобранного прижизненного материала, взятого до заражения коз, во всех случаях получен отрицательный результат.

При семикратном исследовании методом ПЦР отобранного материала от коз после их заражения также во всех случаях получен отрицательный результат. Ни в одной пробе из выбранных нами материалов возбудитель туберкулеза не обнаружен.

При патологоанатомическом осмотре павшей и убитых коз во всех случаях установлена генерализованная форма туберкулеза. При гистологическом исследовании биоматериала выявлены характерные патоморфологические изменения. Бактериологическим исследованием материала выделен возбудитель туберкулеза бычьего вида.

При исследовании методом ПЦР патологического материала от павшей и убитых коз в трех повторах по всем пробам получены положительные результаты.

Заключение

Результаты проведенной нами работы подтвердили неэффективность метода ПЦР для прижизненной диагностики туберкулеза у коз, так как метод ПЦР не позволил нам диагностировать туберкулез у больных животных.

Применение ПЦР для послеубойной диагностики туберкулеза коз позволило во всех случаях констатировать наличие возбудителя туберкулеза в патологическом материале. Результаты ПЦР-исследования полностью коррелируют с результатами бактериологического исследования.

Вывод

Основным звеном в борьбе с туберкулезом животных является диагностика болезни. В последние годы для диагностики многих инфекционных болезней применяют полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Однако, для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота метод ПЦР не нашел широкого применения.

Целью нашей работы было определение возможности применения метода ПЦР при диагностике туберкулеза у коз.

Установлено, что для прижизненной диагностики туберкулеза у коз метод ПЦР неэффективен. Исследование патологического материала от коз позволило диагностировать наличие возбудителя туберкулеза, что подтверждено результатами бактериологического исследования.

SUMMARY

The main link in the control of epidemics of the animal tuberculosis is the disease diagnostic. PCR has been applied for the diagnostic of many infection diseases in recent years. However for the diagnostic of cattle tuberculosis the PCR method didn't widely. The purpose of our work was a determination of the possibility of using of the PCR method in the diagnostic of goats tuberculosis. It is established, that the PCR method is not effective of goat tuberculosis. The investigation of the pathological material from goats has enabled to make a diagnostic of the availability of the tuberculosis agent. It is confirmed by the results of the bacteriological researches.

Литература

1. Гребенникова Т.В., Кальнов С.Л., Забережный А.Д., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А. Молекулярные методы исследования в диагностике туберкулеза // Ветеринарная патология. 2004. № 1–2. С. 92–93.
2. Донченко Н.А., Донченко А.С., Семенихин В.И. Генетическое типирование микобактерий туберкулезного комплекса с помощью анализа ПДФР ампликонов // Ветеринарная патология. 2004. № 1–2. С. 71.
3. Найманов А.Х., Овдиенко Н.П. Современные задачи в борьбе с туберкулезом крупного рогатого скота // Ветинформ. 2002. № 4. С. 8–9.
4. Найманов А.Х., Овдиенко Н.П., Осипова Е.П., Солодова И.В., Суворов В.С. Полимеразная цепная реакция (система sen X3-regX3) при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота // Ветеринарная патология. 2004. С. 96–99.
5. Шаров А.М., Ерошенко Л.А., Суханов И.П. и др. Подготовительные работы при ПЦР-диагностике туберкулеза // Тез. докл. междунар. науч.-практ. конференции «Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с болезнями с/х животных». Ставрополь, 1999. С. 155–156.
6. Шаров А.Н., Суханов И.П., Ерошенко Л.А. Прижизненная диагностика туберкулеза у телят в эксперименте // Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России. Москва, 1999. Т. 1. С. 189.
7. Шаров А.Н., Суханов И.П., Ерошенко Л.А. Полимеразная цепная реакция при диагностике туберкулеза // Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России. Москва, 1999. Т. 1. С. 188.
8. Шаров А.Н. Проблемы ПЦР-диагностики туберкулеза // Ветеринарный консультант. 2003. № 21–22. С. 14–15.
9. Kearns A.M., Magee S.G., Gennery A. et al. Rapid of Mycobacterium bovis BCG by the detection of the RD1 deletion using a multiplex PCR technique // J.Clin.Microbiol. 1999. 566–569.
10. Romero R.E., Garzon D.L., Mejia G.A. et al. Identification of Mycobacterium bovis in bovine clinical samples by PCR species-specific primers // Can. J.Vet.Res., 1999. 101–106.

М.С. Калмыкова (ВИЭВ)

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЖИВОТНЫХ

Для диагностики туберкулеза животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в научно-исследовательских учреждениях и ветеринарных лабораториях на территории России нашли применение комплексные тест-системы для выявления ДНК *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium tuberculosis* производства ЦНИИ Эпидемиологии (ЦНИИЭ), ЗАО «ЛАГИС», Компания «БИОКОМ», а для выявления и дифференциации возбудителей туберкулеза *M. bovis* и *M. tuberculosis* тест-системы производства НПО «НАРВАК» и Института молекулярной генетики РАН.

Тест-системы указанных производителей отличаются праймерами, фланкирующими разные участки гена возбудителя и, соответственно, величиной искомого фрагмента ДНК (таблица 1), составом лизирующего раствора, компоновкой наборов, техническими приемами постановки реакции, в том числе режимом амплификации, наличием или отсутствием внутренне-

го контроля и т.д. (Т.В. Гребенникова с соавт., 1997, 1999; А.Н. Шаров, 2003; А.Х. Найманов с соавт., 2004; Т.В. Гребенникова с соавт., 2004; И.Л. Обухов с соавт., 2004; И.Н. Корнева с соавт., 2004).

Использование полимеразной цепной реакции в диагностике туберкулеза животных регламентировано действующим «Наставлением по диагностике туберкулеза животных», утвержденным Департаментом ветеринарии 18.11.2002 г. Однако широкого применения метод ПЦР при диагностике туберкулеза животных пока не получил. Основной причиной этого является значительное количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов исследований.

Возникновение ложноположительных результатов, как правило, связано с:

- низкой специфичностью тест-систем;
- контаминацией материала в результате нарушения ветеринарно-санитарных правил отбора, транспортировки и хране-