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. научн.-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-

ния проб;

- контаминацией помещений лаборатории при нарушении «Правил проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (основные положения)», утвержденных Департаментом ветеринарии 27.01.1997 г.

- ошибками в работе исследователей.

Причинами ложноотрицательных результатов являются:

- низкая чувствительность тест системы;

- нарушение правил отбора и подготовки проб для исследований, которые могут обусловить отсутствие возбудителя или его ДНК в исследуемой пробе;

- присутствие ингибирующих веществ в исследуемой пробе;

- ошибки в работе исследователей.

Одной из основных причин получения ложноотрицательных результатов является низкая чувствительность используемой тест-системы, которая характеризуется наименьшей концентрацией искомого возбудителя (или его ДНК) в пробе, дающей положительный результат. Чем выше чувствительность тест-системы, тем меньше ложноотрицательных результатов.

Необходимо отметить, что наличие ингибирующих веществ в материале не позволяет увеличивать объем исследуемой пробы, а малый объем ее снижает вероятность обнаружения возбудителя (А.Н. Шаров, 2003).

В тоже время, в результате исследований, проведенных в различных научно-исследовательских учреждениях и ветеринарных лабораториях, показана возможность применения этой реакции при диагностике туберкулеза у животных (А.Н. Шаров с соавт., 2000; И.Н. Корнева с соавт., 2002; А.Х. Найманов с соавт., 2004; Т.В. Гребенникова с соавт., 2004; В.А. Душкин с соавт., 2004; Р.В. Костюк, 2004 и др.).

Целью данной работы было проведение сравнительной оценки чувствительности тест-систем для ПЦР-диагностики туберкулеза животных, в настоящее время

используемых в ветеринарии.

Материалы и методы

Для проведения сравнительной оценки чувствительности тест-систем нами были взяты три комплексные тест-системы: «АмплиСенс МТБ-390/ВКО-750» для выявления ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* методом полимеразной цепной реакции для выявления ДНК *M.bovis* и *M.tuberculosis* производства ЦНИИЭ; ДиаГен-*Mycobacteria* для выявления ДНК микобактерий туберкулеза производства ЗАО «ЛАГИС»; «GenePak DNA PCR test Mtu+bo» производства Компания «БИОКОМ» и две тест-системы для выявления и дифференциации возбудителей туберкулеза *M. bovis* и *M.tuberculosis* производства НПО «НАРВАК» и Института молекулярной генетики РАН.

Тест-системы производства ЦНИИЭ и НПО «НАРВАК» сертифицированы и предназначены для применения в ветеринарии; производства ЗАО «ЛАГИС» — сертифицирована и предназначена для применения в медицине; Компании «БИОКОМ» и ИМГ РАН — экспериментальные.

В качестве положительного материала была использована кровь крупного рогатого скота, контаминированная культурой *M. bovis* (штамм VCG) в разной концентрации. Для этого готовили исходное разведение культуры с содержанием 700 млн. клеток возбудителя в 1 мл крови. Затем методом последовательных разведений получили пробы крови с концентрацией от 70 млн. до 10 клеток в 0,1 мл крови — объем исследуемой пробы. Из каждого разведения выделяли ДНК в соответствии с наставлениями к тест-системам.

В качестве отрицательного (контрольного) материала использовали кровь крупного рогатого скота, свободную от возбудителя туберкулеза.

Полимеразную цепную реакцию проводили в ДНК-амплификаторе «Терцик» производства «ДНК-технология» по программам амплификации, указанным в наставлениях к тест-системам.

Учет результатов амплификации про-

Таблица 1

Длина амплифицированных специфических фрагментов ДНК

Длина специфического фрагмента ДНК	Тест-система производства:				
	ЦНИИЭ	ЛАГИС	БИОКОМ	НАРВАК	ИМГ РАН
<i>M. tuberculosis</i> + <i>M. bovis</i>	390 п.н.	376 п.н.	290 п.н.	352 п.н.	370 п.н.
<i>M. tuberculosis</i>				377 п.н.	
<i>M. bovis</i>					440 п.н.
Внутренний контрольный образец (ВКО)	750 п.н.				

водили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Результаты электрофореза учитывали, просматривая гель в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе «Трансиллюминатор». Результат оценивали по наличию или отсутствию на электрофореграмме светящихся специфических полос ДНК (таблица 1).

В состав тест-системы производства ЦНИИЭ входит внутренний контрольный образец (ВКО). ВКО представляет собой препарат ДНК, несхожий с ДНК искомого микроорганизма. Внесение ВКО в каждую пробу на этапе выделения позволяет контролировать процесс выделения ДНК и ход амплификации в каждой пробирке, поскольку ДНК, выделенная из биологического материала, может содержать примеси ингибиторов, снижающих эффективность ПЦР. При достоверном прохождении реакции внутренний контроль образует специфический фрагмент, отличающийся по размеру от специфических ампликонов.

В тест-системах производства ЦНИ-

ИЭ, ЗАО «ЛАГИС» и Компании «БИОКОМ» для повышения специфичности отжига праймеров и снижения риска образования неспецифических продуктов амплификации предусмотрен так называемый «горячий старт» («Hot-start»), сутью которого является предотвращение возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров. В первых двух тест-системах «горячий старт» обеспечивается механическим разделением компонентов реакционной смеси парафиновой или восковой прослойкой на два слоя (в нижнем слое праймеры с дНТФ, в верхнем — Taq-полимераза и искомая ДНК), которые смешиваются при расплавлении парафина или воска на стадии денатурации в заранее прогретом амплификаторе. В тест-системе производства Компании «БИОКОМ» активные центры Taq-полимеразы блокированы моноклональными антителами. Фермент, связанный с моноклональными антителами, приобретает активность после стадии первой дена-

Таблица 2

Аналитическая чувствительность тест-систем

№ проб	Количество возбудителя в пробе (0,1 мл)	Наличие специфических полос на электрофореграмме на уровне пар нуклеотидов:							
		ЦНИИЭ		ЛАГИС	БИОКОМ	«НАРВАК»		ИМГ РАН	
		Mt+b	ВКО			M.t.+b	M.t.	M.t.+b	M.b.
		390	750	376	290	352	377	370	440
1	70 000 000 кл.	+	-	+	+	+	-	+	+
2	7 000 000 клеток	+	-	+	+	+	-	+	+
3	700 000 клеток	+	+	+	+	+	-	+	+
4	100 000 клеток	+	+	+	+	+	-	+	+
5	10 000 клеток	+	+	+	+	+	-	+	+
6	1 000 клеток	+	+	+	+	+	-	+	+
7	100 клеток	+	+	+	+	+	-	-	-
8	10 клеток	+	+	+	+	+	-	-	-
9	Кровь КРС (свободная от возбудителя туберкулеза)	-	+	-	-	-	-	-	-
10	Отрицательный контроль выделения	-	+	-	-	-	-	-	-
11	Положительный контроль выделения	+	+	Положительный контроль выделения не входит в состав тест-системы		+	-	Положительный контроль выделения не входит в состав тест-системы	
12	Положительный контроль ПЦР	+	-	+	+	+	+	+	+
13	Отрицательный контроль ПЦР	-	-	-	-	-	-	-	-

турации, когда моноклональные антитела денатурируются и освобождают активные центры Taq-полимеразы.

В тест-системах производства НПО «НАРВАК» и ИМГ РАН для дифференциации микобактерий применяется двухступенчатая, так называемая «гнездовая» модификация метода ПЦР («nested PCR») с последовательным использованием внешней и внутренней пар праймеров. После использования первой пары праймеров (для обнаружения комплекса *M. bovis*+*M. tuberculosis*) в первом раунде ПЦР продукт амплификации переносят в другую пробирку с внутренней парой праймеров (для выявления *M. tuberculosis*) и проводят второй раунд ПЦР.

Постановка «nested PCR» более трудоемка по сравнению с «Hot-start» и требует более строгого соблюдения режима работы из-за риска возможной контаминации продуктами амплификации после первого раунда ПЦР.

Результаты исследований

Результаты проведенных исследований оценивали по наличию или отсутствию на электрофореграмме светящихся специфических полос ДНК независимо от степени интенсивности сигнала (наличие специфических полос обозначено знаком «+», отсутствие — «-») (таблица 2)

Отрицательные и положительные контроли выделения и амплификации ДНК указывают на правильность постановки реакции и качественную работу тест-систем.

При исследовании пробы № 9, не содержащей возбудителя туберкулеза, во всех случаях получен отрицательный результат. При исследовании этой пробы тест-системой производства ЦНИИЭ на электрофореграмме присутствовала светящаяся полоса на уровне 750 п.н., соответствующая специфическому фрагменту ВКО. Это позволяет сделать вывод о достоверном отсутствии возбудителя в пробе.

Все протестированные комплексные тест-системы для выявления ДНК возбудителей туберкулеза и тест-система для выявления и дифференциации возбудителей туберкулеза производства НПО «НАРВАК» имеют одинаковую чувстви-

тельность — 10 клеток возбудителя в 0,1 мл пробы (минимально взятая концентрация), а дифференцирующая тест-система производства ИМГ РАН имеет чувствительность ниже - 1000 клеток возбудителя в 0,1 мл пробы.

Выводы

1. Значительным преимуществом тест-системы для выявления и дифференциации возбудителей туберкулеза *M. bovis* и *M. tuberculosis* производства НПО «НАРВАК» является высокая чувствительность тест-системы наряду с возможностью одновременной индикации и дифференциации возбудителей туберкулеза.

Однако, необходимость соблюдения жесткого режима работы при постановке «nested PCR» для исключения получения ложноположительных результатов, а также постановка двух раундов амплификации ДНК, делает работу с этой тест-системой более трудоемкой и длительной.

2. Протестированные три комплексные тест-системы для выявления ДНК *M. bovis* и *M. tuberculosis* производства ЦНИИЭ, ЗАО «ЛАГИС», Компания «БИОКОМ» имеют одинаковую чувствительность, во всех использован «горячий старт», однако преимуществом тест-системы производства ЦНИИЭ является использование внутреннего контрольного образца.

3. Дифференцирующая тест-система производства ИМГ РАН имеет самую низкую чувствительность — 1000 клеток возбудителя в 0,1 мл пробы. Относительно низкая чувствительность тест-системы может являться причиной получения ложноотрицательных результатов в случае низкой бактериальной нагрузки пробы.

Заключение

При необходимости одновременной индикации и дифференциации возбудителей туберкулеза животных, наиболее целесообразно использовать тест-систему для выявления и дифференциации возбудителей туберкулеза методом полимеразной цепной реакции производства НПО «НАРВАК». Для индикации возбудителей туберкулеза животных предпочтительнее тест-система для выявления ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* производства ЦНИИЭ.

SUMMARY

As a result of carrying out of a comparative estimation of sensitivity of five tests-systems for ПЦР- diagnostics of a tuberculosis of the animals used in veterinary science it is established, that the least sensitive is the test system of Institute of molecular genetics of the Russian Academy of Science.

If necessary simultaneous indication and differentiation of activators of a tuberculosis of animals, it is the most expedient to use test-system for revealing and differentiations of activators of a tuberculosis a method polymerase chain reaction of manufacture NPO «NARVAK». For indication of activators of a tuberculosis of animals the test-system is more preferable to revealing DNA *Mycobacterium tuberculosis complex* manufacture ЦНИИЭ.

Литература

- Grebennikova T.V., Grabovetsky V.V., Kalnov S.L., Nepoklonov E.A. Differential diagnostics of mycobacteria by PCR in blood and tissues from animals. 1997 // First International Veterinary Vaccines and Diagnostic Conference. Madison, Wisconsin, USA. 27–31 July. P. 72
- Grebennikova T.V., Grabovetsky V.V., Shumsky N.I., Kalnov S.L., Nepoklonov E.A. Differential diagnostics of mycobacteria by polymerase chain reaction. 1999. Veterinaria (Rus.). N 3. P. 17–20.
- 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.
- Душкин В.А., Воинова О.Н., Ефимычев И.В., Кудрячков В.М. Опыт работы по использованию метода ПЦР в диагностике туберкулеза Крупного рогатого скота в Нижегородской области // Ветеринарная патология. 2004. № 1–2. С. 99–104.
- Костюк Р.В. ПЦР при контроле благополучия скота по туберкулезу. // Ветеринарная патология. 2004. № 1–2. С. 105–107.
- Корнева И.Н., Осипова Е.П., Найманов А.Х. и др. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота с применением полимеразной цепной реакции // Сб. тезисов 4-ой Всероссийской научно-практ. конференции «Генодиагностика инфекционных заболеваний». М. 2002. С. 343–344.
- Корнева И.Н., Демкин В.В. Конструирование ПЦР-тест-систем для обнаружения и идентификации микобактерий туберкулеза у животных // Ветеринарная патология. 2004. № 1–2. С. 95–96.
- «Наставление по диагностике туберкулеза животных», утверждено Департаментом ветеринарии 18.11.2002 г.
- Найманов А.Х., Овдиенко Н.П., Осипова Е.П., Солодова И.В., Суворов В.С. Полимеразная цепная реакция (система sep X3-regX3) при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота // Ветеринарная патология. 2004. № 1–2. С. 96–99.
- Обухов И.Л., Букова Н.К., Клименкова О.В. Усовершенствование коммерческих ПЦР-тест-систем для диагностики туберкулеза животных // Ветеринарная патология. 2004. № 1–2. С. 94.
- «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (основные положения)», утверждены Департаментом ветеринарии 27.01.1997 г.
- Шаров А.Н., Ерошенко Л.А., Суханов И.П. и др. Эффективность методов прижизненной диагностики туберкулеза // Ветеринария. 2002. № 2. С. 16–18.
- Шаров А.Н. Проблемы ПЦР-диагностики туберкулеза // Ветеринарный консультант. 2003. № 21–22. С. 14–15.

И.А. Архипов, А.А. Смирнов

(Всероссийский институт гельминтологии им. К.И. Скрябина, Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии)

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА ПРАЗИЦИД В БОРЬБЕ С ГЕЛЬМИНТОЗАМИ ПЛОТЯДНЫХ

Официальная медицинская статистика отмечает, что ежегодно в России паразитарными болезнями болеют 1,6 млн. человек. В рамках реализации федеральной целевой программы «Дети севера» массовое обследование детей подтвердило высокий уровень (30–60%) их пораженности кишечными паразитами [4]. Причем, во многих случаях источником заражения человека являются домашние собаки и кошки. Паразитарные заболевания собак и кошек зарегистрированы повсеместно как среди служебных и охотничьих собак, так и среди декоративных, комнатных и, особенно, бродячих животных. Гельминты вызывают серьезную патологию у животных, приводя иногда к гибели щенков и котят и, кроме того, представляют угрозу для своих владельцев. Так, человек может заразиться 32 видами гельминтов, являющихся общими для животных и человека [2]. Загрязняя внешнюю среду испражнениями, содержащими возбудителей болезней, за-

раженные собаки и кошки представляют опасность для всех окружающих.

В последние годы поголовье собак в Москве и других крупных городах значительно увеличилось. По мнению специалистов популяция собак в мегаполисе Москвы достигает миллиона. Количество домашних кошек в городе находится в тех же пределах. При такой большой численности плотоядных и при том, что многие из них безнадзорны, проблема загрязнения окружающей среды их фекалиями, загрязненными яйцами гельминтов и простейших, становится все более острой. Этому способствует отсутствие специально выделенных мест для выгула собак и низкий уровень санитарной культуры их владельцев. Известно, что каждая собака выделяет в течение суток, в среднем, около 270 г фекалий. По расчетам на территории Москвы собаки ежедневно оставляют до 270 т фекалий [5]. Особенно остро это проявляется в весенний период, когда фекалии, на-