

Таким чином, розпочаті дослідження з визначення специфічності та чутливості методу ПЛР для типування польових ізолятів і музейних штамів бруцел видів *B. abortus* і *B. suis*.

Висока специфічність ПЛР є важливим чинником при проведенні диференційної діагностики бруцельозу з іншими інфекційними захворюваннями, збудники яких мають спільні антигенні детергенти з бруцелами.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується проведення робіт з молекулярно-генетичної паспортизації музейних штамів та ізолятів, що зберігаються в колекції штамів і мікроорганізмів ННЦ «ІЕКВМ».

Висновки. 1. Сформовано попередні дані секвенованих послідовностей геномного матеріалу збудників бруцельозу (*B. abortus* і *B. suis*), встановлені видові та родові відмінності їх геному.

2. Встановлені оптимізовані протоколи ампліфікації, які забезпечують високу специфічність і чутливість реакції при детекції ДНК збудника бруцельозу.

Список літератури

1. Бусол, В.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных [Текст] / В.А. Бусол, А.Ф. Бабкин, П.Н. Жованик. – К. : Урожай, 1991. – 176 с.
2. Балахонов, С.В. Оптимизация детекции бруцелл с помощью полимеразной цепной реакции [Текст] / С.В. Балахонов, М.Ю. Шестопалов, А.И. Калиновский // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. – 1996. – № 4. – С. 33–35.
3. Шумилов, К.В. Идентификация бруцелл методом ПЦР [Текст] / К.В. Шумилов [и др.] // Ветеринария. – 1996. – № 12. – С. 19–23.
4. Шарова, И.Н. Совершенствование тест-системы для выявления возбудителя бруцеллеза методом ПЦР [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук / И.Н. Шарова. – Саратов, 2001. – 20 с.
5. Інструкція про заходи з профілактики та боротьби з бруцельозом тварин [Текст] / затв. Держ. департаментом вет. медицини Мінагропрому України № 4 від 25.01.2000. – К., 2000. – 20 с.
6. Настанова по діагностиці бруцельозу тварин [Текст] / затв. Міністерством АПК України № 15-14/55 від 10.02.1998. – К., 1998. – 58 с.
7. Желудков, М.М. Метод ПЦР для идентификации и дифференциации бруцелл [Текст] / М.М. Желудков, Ю.К. Кулаков, Т.А. Толмачева // Материалы IX съезда Всерос. науч.-практ. общ-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – М., 2007. – Ч. 3. – С. 5.
8. Дубинина, И.Г. Роль метода полимеразной цепной реакции в генодиагностике [Текст] / И.Г. Дубинина // Новые генетические технологии. – М., 1998. – С. 20–37.
9. Дентовская, С.В. Использование молекулярно-генетических подходов для лабораторной диагностики бруцеллеза [Текст] / С.В. Дентовская, А.Н. Куличенко // Пробл. особо опасных инф. – Саратов, 1999. – С. 3–11.
10. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* de DNA amplification [Text] / G.G. Bailey [et al.] // J. Trop. Med. Hyg. – 1992. – Vol. 95, № 4. – P. 271–275.
11. Bassam, B.J. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [Text] / B.J. Bassam, G. Gaetano-Anolles, P.M. Gresshoff // Anal. Biochem. – 1991. – Vol. 196. – P. 80–83.
12. Rapid and simple method for purification of nucleic acids [Text] / R. Boom [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1990. – Vol. 28. – P. 495.
13. Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with fluorogenic probes to measure C-erb B-2 oncogene amplification [Text] / S. Jelmini [et al.] // Clin. Chem. – 1997. – Vol. 43, № 5. – P. 752–758.

TYPING OF ANIMAL BRUCELLOSIS AGENTS BY PCR

Degtiaryov I.M., Orlov S.M., Obuhovska O.V., Gerilovych A.P., Solodianskin O.S., Goraichuk I.V.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov

The research to test the parameters of the PCR for typing of field isolates and museum strains of Brucella species B. abortus and B. Suis has been conducted. Specific and generic differences between their genome were established. The specificity of the strip with a wavelength of 272 bp, which corresponds to the nucleotide sequence of the DNA of the gene B. suis was defined.

УДК 619: 616.98:579.882.11-07

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СРЕДСТВ РЕТРОСПЕКТИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИОЗА ЖИВОТНЫХ

Евстифеев В.В., Барбарова Л.А., Нигматуллина Д.И., Хусаинова Г.И., Мифтахов Н.Р.

*ФГБУ «Федеральный Центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»,
г. Казань, Российская Федерация*

Несмотря на достижения в молекулярной биологии в последние десятилетия и внедрение новых методов диагностики, таких как ПЦР в ветеринарную практику основными и массовыми исследованиями на хламидиоз у животных остаются ретроспективные методы РСК и ИФА. Они основаны на выявлении специфических антител в сыворотках крови животных к хламидиям, выявляемым при помощи антигенов обладающих родовой специфичностью по отношению к этим возбудителям.

Однако имеющиеся в настоящий момент способы изготовления этих антигенов, не позволяют добиться нужной чувствительности, специфичности и активности препаратов или же не имеют промышленных (полупромышленных) перспектив ввиду сложности изготовления и получения малых объемов антигенов. Одновременно с этим, имеющиеся способы вредны ввиду применения в технологии изготовления антигенов сильнодействующих и ядовитых веществ, наносящих вред здоровью человека и загрязняющие окружающую среду.

Несмотря на то, что метод ИФА применялся различными исследователями для диагностики хламидиоза и даже были разработаны наборы, все это осталось только на уровне научных исследований и не нашло применения в широкой ветеринарной практике ввиду отсутствия способа получения таких антигенов, которые при условии получения высокой специфичности и активности, необходимой для постановки ИФА, имели бы промышленную технологию изготовления.

В ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» было налажено серийное производство «Наборов антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов животных» на основе родоспецифического антигена хламидий изготавливаемого по методу Боровика Р.В. с соавторами (Авт. св-во № 543259, 1976 г.) в технологии изготовления, которого использовали 2-меркаптэтанол, являющийся сильнодействующим ядовитым веществом. Антигены, приготовленные по этому способу, не всегда удовлетворяли своей активностью, иногда проявляли антикомплементарные свойства и не позволяли выявлять специфические антитела методом ИФА ввиду своей низкой специфичности.

Исходя из этого, необходимо было разработать метод получения специфического хламидийного антигена, который бы имел более высокую активность и специфичность по сравнению с аналогами позволял проводить исследования в РСК и ИФА. Одновременно с этим из технологии следовало исключить 2-меркаптэтанол, что сильно затрудняло его изготовление ввиду специальных условий производства.

На первоначальном этапе исследований в технологическую схему изготовления антигена был введен дополнительный этап обработки препарата эфиром, что позволило устранить антикомплементарность антигенов и значительно, в 2–3 раза повысить их активность. При этом экстракция антигена производится не из цельной микробной клетки, а предварительно разрушенной детергентами, что улучшает доступность антигена для экстракции. С помощью этого повышается степень чистоты и активность препарата.

Еще одной важной задачей в усовершенствовании технологии получения специфического хламидийного антигена был подбор вещества, аналогичного по действию 2-меркаптэтанолу, позволяющего сохранять активность и стабильность антигенов при изготовлении. В качестве такого вещества нами был испытан этиловый спирт. Его действие оказалось аналогичным и удовлетворяло по всем параметрам, используемым в технологии изготовления антигенов.

Материалы и методы исследований. Нами было проведено более 10 серий опытов по сравнительному изучению 2-х разных способов изготовления специфических хламидийных антигенов. Антигены готовили параллельно из одного и того же материала и исследовали в РСК с аналогичными сыворотками крови, как с контрольными, полученными в лабораторных условиях, так и с «полевыми» – от животных из различных неблагополучных по хламидиозу хозяйств. Всего на первоначальном этапе было исследовано более 820 сывороток крови свиней, крупного и мелкого рогатого скота.

Результаты исследований и их обсуждение. Для наглядности в таблице 1 приведены сравнительные результаты, полученные при исследовании 3 серий антигенов приготовленных двумя разными способами, а в таблице 2 приведены результаты исследования сывороток крови животных из неблагополучных хозяйств.

Таблица 1 – Результаты контроля на активность и специфичность антигенов изготовленных двумя способами

№ серии антигенов	Способ изготовления	Титр контрольных сывороток в РСК				Контроль антикомплементарности
		Сыворотка позитивная № 1	Сыворотка позитивная № 2	Сыворотка позитивная № 3	Сыворотка негативная №1	
1	традиционно	1:64	1:64	1:64	-	-
	с эфиром	1:512	1:256	1:256	-	-
2	традиционно	1:32	1:32	1:32	1:5	1:5
	с эфиром	1:256	1:256	1:256	-	-
3	традиционно	1:32	1:64	1:64	-	-
	с эфиром	1:128	1:256	1:256	-	-

Таблица 2 –Результаты сравнительного исследования в РСК на хламидиоз сывороток крови с двумя специфическими хламидийными антигенами

№	Наименование обследованных хозяйств	Кол-во сывороток крови	Положительно реагировало в РСК с антигеном	
			Традиционным	Испытуемым
1	ООО «Нур-Агро» Ютазинский район РТ	25	5	14
2	ООО а/ф «Сирази» Чистопольский район РТ	16	4	7
3	ИП«Сулейманов А.И.», Кукморский район РТ	7	2	5
4	ООО «Намус», Кукморский район РТ	19	10	19
5	ООО«Актай», Мамадышский район РТ	39	8	19
6	ООО «Сергеевское» Саратовская область Каменский район	45	9	18
ИТОГО:		151	38 (27 %)	82 (58 %)

При исследовании сывороток крови животных из неблагополучных по хламидиозу хозяйств антиген, приготовленный по новому способу, выявлял в два с лишним раза больше позитивных животных, что говорило о его более высокой чувствительности.

В дальнейшем разработанный антиген успешно прошел комиссионные испытания, и вошел в состав «Набора антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиоза животных».

Одновременно с этим была установлена возможность использования разработанного антигена в ИФА. Можно было предполагать, что этот антиген покажет хорошие результаты при использовании его для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных в ИФА.

Для исследований использовали сыворотки крови КРС и свиней из не благополучных по хламидиозу животноводческих хозяйств РТ и других регионов РФ. Всего исследованию было подвергнуто 383 пробы сывороток крови КРС и 36 проб сывороток свиней из 33 неблагополучных по хламидиозу хозяйств. Для сравнения все пробы сывороток крови параллельно подвергались исследованию в РСК. Результаты этих исследований обобщены в таблице 3.

В результате проведенных исследований установлено, что использованный нами антиген позволяет диагностировать хламидиоз крупного рогатого скота и свиней в иммуноферментном анализе. При этом в ИФА испытуемый антиген показал высокую специфичность и большую, по сравнению с РСК, активность. Так в ИФА при диагностике хламидиоза КРС было выявлено в 1,7 раза, а при диагностике хламидиоза свиней в 2 раза больше положительных результатов.

Таблица 3 –Результаты сравнительного исследования в РСК и ИФА сывороток крови КРС и свиней

№	Вид животных	Кол-во исследуемых проб	Реагировало, кол-во (%)	
			в ИФА	в РСК
1	КРС	383	126 (32,9)	79 (20,6)
2	Свиньи	36	10 (27,7)	5 (13,8)

Также в ходе проведенных исследований были разработаны контрольные компоненты для ИФА, отобраны реактивы, подобраны оптимальные условия проведения реакции, температура и время экспозиции компонентов на разных этапах анализа.

Учитывая положительные результаты лабораторных испытаний, на основе предложенного специфического хламидийного антигена были сконструированы «Набор препаратов для диагностики хламидиоза КРС методом ИФА» и «Набор препаратов для диагностики хламидиоза свиней методом ИФА».

На производство, контроль и применение опытных серий наборов были разработаны и утверждены соответствующие нормативно-технические документы: инструкция по изготовлению наборов, технические условия и инструкция по применению.

Производственные испытания проводились на базе ФГУ «Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория» (г. Казань). Всего с применением экспериментальных серий наборов было испытано 1008 проб сывороток крови КРС и 200 проб сывороток крови свиней из 9 неблагополучных по хламидиозу животноводческих хозяйств РТ и других регионов РФ.

Результаты производственного испытания «Набора препаратов для диагностики хламидиоза КРС методом ИФА» и «Набора препаратов для диагностики хламидиоза свиней методом ИФА» показали их высокую эффективность, что позволяет рекомендовать испытанные тест-системы для ретроспективной диагностики хламидиоза КРС и свиней.

По результатам исследований была оформлена заявка на патент «Способ получения антигена для ретроспективной диагностики хламидиоза животных» и получено положительное решение о выдаче патента.

Выводы. Таким образом, в ходе проведенных исследований удалось разработать технологию изготовления специфического хламидийного антигена, который обладает более высокой активностью и специфичностью по сравнению с имеющимися аналогами, но, в отличие от них, исключает использование сильнодействующих ядовитых веществ при изготовлении и позволяет проводить ретроспективную диагностику хламидиоза, по крайней мере, двумя методами – в РСК и в ИФА, благодаря чему на его основе сконструированы три тест-системы прошедшие успешные испытания.

Список литературы

1. Домейка, М.А. Некоторые методические особенности проведения иммуноферментного анализа для изучения хламидиозов КРС [Текст] / М.А. Домейка, В.П. Ришквичене, В.И. Люткивчине // Ферментативные препараты в ветеринарии и животноводстве : тез. докл. науч.-практ. конф., Каунас, 28-29 сент. 1989. – Каунас, 1989. – С. 32–33.
2. Изучение набора диагностикумов для иммуноферментного анализа при хламидиозе свиней [Текст] / В.В. Евстифеев [и др.] // Вет. биотехнология: настоящее и будущее : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию ФГУП «Щелковский биокомбинат», 20-23 сент. 2004. – С. 189–191.
3. Усовершенствование комплементсвязывающего антигена для диагностики хламидиоза животных [Текст] / В.В. Евстифеев [и др.] // Вет. биотехнология: настоящее и будущее : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию ФГУП «Щелковский биокомбинат», 20-23 сентября, 2004. – С. 187–188.
4. Коллинз, У.П. Новые методы иммуноанализа [Текст] / У.П. Коллинз. – М.: Мир, 1991. – С. 117–121.
5. Хламидиозы: совершенствование диагностики, мер борьбы и специфической профилактики [Текст] / Р.Х. Хамадеев [и др.] // Актуальные пробл. вет. медицины : материалы междунар. науч.-практ. конф., 25-26 сент. 2003 г. – Ульяновск, 2003. – Т. 1. – С. 188–192.
6. Donn, A. Serological diagnosis of chlamydial abortion in sheep and goat: comparison of the complement fixation test and enzyme-linked immunosorbent assay employing solubilised proteins as antigen [Text] / A. Donn [at al.] // Vet. Microbiol. Infect. J. – 1997. – P. 27–36.

IMPROVEMENT OF RETROSPECTIVE DIAGNOSIS MEANS OF ANIMAL CHLAMYDIOSIS

Evstifeev V.V., Barbarova L.A., Nigmatullina D.I., Khusainova G.I., Miftahov N.R.

Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan

At the stage of conducted experiments we have developed the new technology of specific chlamydial antigen which possesses the high activity and specificity in comparison with the available methods. Our technology allows to eliminate the usage of highly toxic substances in the manufacture and carry out retrospective diagnosis of Chlamydia, at least by two methods reaction fixation compliments and ELISA due to on this technology are constructed three test system which are successfully passed the test.

УДК 619:616.98:519.21:636.8

ЧУТЛИВІСТЬ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН ДО ЗБУДНИКА *M. PARATUBERCULOSIS*

Завгородній А.І., Позмогова С.А., Гірка М.О., Іванов Г.Б.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Не дивлячись на проведені профілактичні та оздоровчі заходи, паратуберкульоз тварин продовжує наносити тваринництву багатьох країн світу значні економічні збитки [1,2].

Серед дослідженої поголів'я тварин молочних стад інфікованість тварин збудником паратуберкульозу в Англії складає 17,4 %, Бельгії – 6 %, Словенії – 11,6 %, Данії – 70 %, Бразилії – 7,9 %, Нідерландах – 71 %, Аргентині – 56 %. За даними міністерства сільського господарства США 20–40 % молочного скота інфіковані збудником паратуберкульозу. Загибель тварин у цих країнах складає біля 25 % (МЕБ).

У зв'язку з широким розповсюдженням хвороби, в окремих країнах, включаючи Австралію, Норвегію, Ісландію, Японію, Нідерланди та США, розроблені національні програми з контролю, боротьби та профілактики паратуберкульозу (МЕБ).

Використання прижиттєвих методів діагностики (алергічного та серологічного) не в повній мірі дозволяють повністю виявити латентно хворих тварин у неблагополучних щодо паратуберкульозу стадах. Використання алергенів туберкуліну (ПГД) для птиці, а за кордоном йоніну для діагностики цього захворювання також не є специфічними та дають позитивні реакції у тварин, інфікованих іншими видами мікобактерій [3].

Використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) дозволяє отримати позитивні результати у різних видів тварин, але не в усіх випадках отримані позитивні результати підтверджуються іншими методами досліджень [4].

Важливим також залишається розробка експериментальної лабораторної моделі при паратуберкульозі, вивчення біологічних властивостей збудника та оптимізація методики ідентифікації збудника хвороби.

Мета досліджень. Вивчити чутливість лабораторних тварин (кролики, миші та мурчаки) до збудника паратуберкульозу.

Матеріали та методи. Дослідження з експериментального зараження лабораторних тварин проводились на клінічно здорових тваринах, які до початку експерименту не реагували на внутрішньошкірне введення туберкуліну (ПГД) для ссавців і птиці. Для проведення дослідів було відібрано 63 кролика 1, 2 та 12-місячного віку породи шиншила, яких розділили на 3 дослідні та контрольні групи. Кроликів різних вікових груп за-