

УДК 619:616.98:579.873.21-07

В.М. КАЛМЫКОВ, А.Х. НАЙМАНОВ

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко» (ВИЭВ)

М.С. КАЛМЫКОВА

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина»

Е.А. ДОЛГОВА, М.В. АЛЬВАРЕС ФИГЕРОА

ФГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора (ЦНИИЭ)

ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛЕРГЕНОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ШИРОКОЙ ВЕТЕРИНАРНОЙ ПРАКТИКЕ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЁЗА ЖИВОТНЫХ

Установлено, что аллергены, применяемые в нашей стране для диагностики туберкулёза животных, не содержат возбудителей туберкулёза и ДНК-возбудителей туберкулёза.

Ключевые слова: *аллергены, туберкулёз, КАМ, ППД-туберкулин, ПЦР, ПЦР-исследование, тест-система.*

V.M. KALMYKOV, A.H. NAYMANOV

All-Russian research institute of experimental veterinary medicine named Ja.R. Kovalenko

M.S. KALMYKOVA

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I. Skryabin

E.A. DOLGOVA, M.V. ALVAREZ FIGEROA

Federal state institution of science «Central research institute of epidemiology»

PCR-RESEARCH OF ALLERGENS, USED IN A BROAD VETERINARY PRACTICE IN THE DIAGNOSIS OF ANIMAL TUBERCULOSIS

Established that the allergens used in our country for the diagnosis of animal tuberculosis, do not contain tuberculosis pathogens or tuberculosis DNA.

Keywords: *allergens, tuberculosis, CAM, PPD-tuberculin, PCR, PCR-research, PCR-Kit.*

В настоящее время мероприятия по профилактике и борьбе с туберкулёзом животных в Российской Федерации проводят в соответствии с санитарными и ветеринарными правилами «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных», утверждёнными Госкомсанэпиднадзором и Департаментом ветеринарии МСХ Российской Федерации 18 июня 1996 г., и «Наставлениями по диагностике туберкулёза животных», утверждёнными Департаментом ветеринарии МСХ Российской Федерации 18 ноября 2002 г.

В соответствии с этими утверждёнными нормативными документами основным методом прижизненной диагностики туберкулёза крупного рогатого скота является внутрикожная проба с ППД-туберкулином для млекопитающих. В качестве дополнительных методов диагностики применяют глазную пробу, пальпебральную пробу, внутривенную пробу, симультанную пробу с ППД-туберкулином для млекопитающих и комплексным аллергеном из атипичных микобактерий (КАМ) и симультанную пробу с ППД-туберкулином для млекопитающих и ППД-туберкулином для птиц.

Симультанную пробу с ППД-туберкулином для млекопитающих и ППД-туберкулином для птиц применяют для дифференциации неспецифических реакций у крупного рогатого скота и свиней при первичной по-

становке диагноза и для контроля за благополучием животных по туберкулёзу в стадах, где реакции на туберкулин обусловлены сенсбилизацией животных микобактериями комплекса авиум-интрацеллюляре или атипичными микобактериями.

Симультанную пробу с ППД-туберкулином для млекопитающих и КАМ применяют для диагностики туберкулёза крупного рогатого скота при первичной постановке диагноза, а также для контроля за благополучием хозяйств, где реакции на туберкулин обусловлены сенсбилизацией животных атипичными микобактериями.

В последние годы в доступной литературе появились работы некоторых исследователей (А.П. Лысенко с соавт., 1998; В.В. Власенко с соавт., 2003), указывающие, что в процессе изготовления туберкулина не происходит глубокой биологической очистки, т.к. технологический регламент не может обеспечить стерильность и специфичность препарата. Поэтому нельзя исключать возможность размножения адаптивных форм возбудителя туберкулёза, которые могут поступать с туберкулином в организм животных после многократных внутривенных введений туберкулина.

Противоположное мнение высказывают В.Е. Козлов, В.М. Безгин (2004, 2006), указывая, что в технологию изготовления туберкулинов включён тест на специфическую безвредность, как общепринятое междуна-

Результаты культурального и ПЦР-исследования аллергенов, применяемых при диагностике туберкулёза животных

| Аллерген | Культуральное исследование на питательной среде | | ПЦР-исследование тест-системой: | |
|--|--|---------|--|---------|
| | Левенштейна-Йенсена | ФАСТ-ЗЛ | «МТБ-КОМ-FRT» | «АВИУМ» |
| ППД-туберкулин для млекопитающих | Отсутствие роста микобактерий в течение всего срока наблюдения | | ДНК возбудителей туберкулёза (<i>M.bovis</i> , <i>M.tuberculosis</i> , <i>M.avium</i>) не выделена | |
| ППД-туберкулин для птиц | Отсутствие роста микобактерий в течение всего срока наблюдения | | | |
| КАМ | Отсутствие роста микобактерий в течение всего срока наблюдения | | ДНК возбудителей туберкулёза (<i>M.bovis</i> , <i>M.tuberculosis</i> , <i>M.avium</i>) не выделена | |
| Смывы с поверхности питательных сред Левенштейна-Йенсена и ФАСТ-ЗЛ | - | - | ДНК возбудителей туберкулёза (<i>M.bovis</i> , <i>M.tuberculosis</i> , <i>M.avium</i>) не выделена | |

родное требование безопасности для туберкулиновых препаратов, т.е. готовый препарат не содержит живых возбудителей туберкулёза. Туберкулин представляет собой очищенный протеин, так называемый ППД (PPD – Purified Protein Derivate – очищенный дериват белка) туберкулиногенных штаммов возбудителя туберкулеза бычьего вида.

Учитывая актуальность проблемы туберкулёза в нашей стране и имеющиеся сомнения в качестве аллергенов для диагностики туберкулёза животных, целью нашей работы было провести культуральное и ПЦР-исследование ППД-туберкулина для млекопитающих, ППД-туберкулина для птиц и аллергена сухого очищенного комплексного из атипичных микобактерий (КАМ) производства ФГУП «Курская биофабрика» – фирма БИОК в целях определения возможности выявления микобактерий и ДНК микобактерий.

Материалы и методы. В работе использованы:

- «Туберкулин очищенный (ППД) для млекопитающих» – стандартный раствор, серия №3, контроль №3, изготовлен 27.01.09 г. (срок годности 2 года);

- «Туберкулин очищенный (ППД) для птиц», серия 15, контроль 15, изготовлен 14.08.2008 г. (срок годности 3 года);

- «Аллерген сухой очищенный комплексный из атипичных микобактерий (КАМ)», серия 7, контроль 7, изготовлен 25.07.2007 г. (срок годности 5 лет);

- для культурального исследования использовали питательные среды: Левенштейна-Йенсена и ФАСТ-ЗЛ;

- для ПЦР-исследования использовали тест-системы «МТБ-КОМ-FRT» для амплификации участка ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», «АВИУМ» для выявления ДНК *Mycobacterium avium* с электрофоретической детекцией в агарозном геле производства ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора;

- секвенирование специфических последовательностей 16S рДНК и internal transcribed spacer (ITS) региона проводили в соответствии с алгоритмом типирования микобактерий, предложенным American Society for Microbiology;

- постановку ПЦР и анализ результатов проводили на приборе RotorGene-6000 производства «CorbettResearch» (Австралия).

Для культурального и ПЦР-исследования использовали нативные растворы аллергенов, концентрат, полученный путём многократного центрифугирования при 12000 об./мин. в течение 15 минут с целью получения осадка, и надосадочную жидкость (каждую пробу исследовали в трёх повторях).

Кроме того, для ПЦР-исследования были взяты смывы с поверхности питательных сред через 10, 30, 45 и 60 дней после посева аллергенов.

Культуральное исследование проводили путём посева каждой полученной пробы на 10 пробирок с питательной средой Левенштейна-Йенсена и на 10 пробирок со средой ФАСТ-ЗЛ. Просмотр посевов проводили через каждые 3–5 дней в течение трёх месяцев.

Результаты проведённых исследований представлены в таблице.

Как видно из данных таблицы, при культуральном и ПЦР-исследовании ППД-туберкулина для млекопитающих, ППД-туберкулина для птиц и аллергена сухого очищенного комплексного из атипичных микобактерий (КАМ) возбудители туберкулёза животных и ДНК возбудителей туберкулёза животных не обнаружены.

ППД-туберкулин для птиц и КАМ были исследованы с помощью алгоритма типирования микобактерий, предложенного American Society for Microbiology, основанного на секвенировании специфических последовательностей 16S рДНК и internal transcribed spacer (ITS) региона. Данный алгоритм позволяет обнаруживать микобактерии и определять их видовую принадлежность путем сравнения анализируемой последовательности 16S рДНК и региона ITS с аналогичными последовательностями, приведенными в международной базе данных RIDOM [<http://rdna4.ridom.de/mycobacteria/index.html>].

При амплификации ДНК, выделенной из КАМ и ППД-туберкулина для птиц согласно указанному протоколу, специфический ампликон получен не был, что свидетельствует об отсутствии в исследованном материале ДНК микобактерий.

Вывод. Полученные результаты культурального, ПЦР-исследования и секвенирования показывают, что ППД-туберкулин для млекопитающих, ППД-туберкулин для птиц и КАМ производства ФГУП «Курская биофа-

брика» – фирма БИОК – не содержат возбудителей туберкулеза животных, ДНК возбудителей туберкулеза животных и ДНК нетуберкулезных микобактерий.

Список литературы

1. Власенко В.В. Туберкулёз в фокусе проблем современности. Винница: Наука, 1998. 35 с.
2. Власенко В.В., Лысенко А.П., Дзюмак М.А. и др. Экологический мониторинг при туберкулинодиагностике крупного рогатого скота // Агроэкологический журнал, 2003. №1. С. 76-79.
3. Калмыкова М.С. Диагностическая ценность ПЦР – тест-систем при туберкулезе животных: Автореф. дисс. ... канд. вет. наук. М., 2007. 27 с.
4. Козлов В.Е., Букова Н.К., Найманов А.Х. Оценка эффективности и специфичности коммерческих серий туберкулина (ППД) для млекопитающих отечественного производства // Ветеринарная патология, 2004. №1-2. С. 82-85.
5. Козлов В.Е. Гармонизация требований к туберкулиновым препаратом с международными нормативными документами: Мат. межд. юбилейной научно-практич. конф., посв. 110-летию Курской биофабрики и агробиологической промышленности России. Курск, 2006. С. 14-17.
6. <http://rdna4.ridom.de/mycobacteria/index.html>.

Контактная информация:
victor_ka@bk.ru
тел.: 8(919)101 46 40

УДК 619:616.37-002-071:636.4

А.П. РУССКИХ, С.Д. АНДРЕЕВА, А.Б. ПАНФИЛОВ

Вятская государственная сельскохозяйственная академия, г. Киров

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ
СУБСТРАТОВ СВИНЕЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОГО
ДЕСТРУКТИВНОГО ПАНКРЕАТИТА**

Для диагностики острого деструктивного панкреатита (ОДП) использовались различные методы. В статье описаны результаты комплексного исследования функционального статуса организма свиней при развитии ОДП в условиях эксперимента. Впервые выявлено, что развитие ОДП у свиней сопровождается полиорганной недостаточностью.

Ключевые слова: *свиньи, острый деструктивный панкреатит, моделирование, биологические жидкости, диагностика.*

A.P. RUSSKIH, S.D. ANDREEVA, A.B. PANFILOV

Vyatka state agricultural academy

**MORPHOLOGIC CHARACTERIZATION OF SEROUS FLUID PIGS IN MODELLING
OF ACUTE DESTRUCTIVE PANCREATITIS**

Different methods were used for diagnostics of acute destructive pancreatitis. In article were written results of complex study functional condition of pigs under development acute destructive pancreatitis in experiment. For the first time expose what development acute destructive pancreatitis of pigs accompanied by multiple organ failure.

Keywords: *pigs, acute destructive pancreatitis, modelling, serous fluid, diagnostics.*

В настоящее время достаточно подробно изучен острый панкреатит у человека, в связи с этим в литературе опубликовано большое количество работ [4, 5, 6]. В то время как исследованию указанной патологии у животных уделено недостаточное внимание, **актуальность**, связанная с изучением данной проблемы, в большей степени обусловлена отсутствием комплексной диагностики острого панкреатита у большинства видов животных, в том числе сельскохозяйственных [1]. Поэтому **целью** проводимого исследования являлось изучение морфофункционального статуса организма свиней с использованием различных методов диагностики при моделировании у них острого деструктивного панкреатита. Нами впервые изучены возможности использования кристаллоскопии биологических субстратов в сопоставлении с основными диагностическими методами исследования у свиней.

Материал и методы. Эксперимент проведен на кафедре хирургии и акушерства Вятской ГСХА с соблю-

дением положений Европейской конвенции по защите домашних животных (№ 125 от 13.11.87 г.). Перед проведением исследования животных разделили на 2 группы: опытную и контрольную, по 4 и 5 животных соответственно. Поросята обеих групп подобраны по принципу аналогов в возрасте 30 дней. Вес животных составил 5–5,5 кг. В качестве вводного наркоза был использован «Ветранквил 1%» (доза – 1 мл / 100 кг массы), основного – «Золетил 50» (доза – 15 мг / 1 кг массы тела); местная инфильтрационная анестезия осуществлялась 0,5%-ным раствором новокаина. Пороссятам опытной группы осуществлялось воздействие на поджелудочную железу препаратом «КриоФарма» [2]. Животным контрольной группы криообработка поджелудочной железы не проводилась. Пороссятам обеих групп после проведения лапаротомии на брюшную стенку последовательно наложены швы. В послеоперационный период проводился контроль функционального состояния каждого животного.