

УДК 636.2:579.835.12

Жансеркенова О.О., Касымбекова Ш.Н., Усенбеков Е.С., Анарбаева А.С.

Казахский национальный аграрный университет, г. Алматы

ПЦР ДИАГНОСТИКА В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Аннотация

Диагностика кампилобактериоза КРС с применением 5 'Taq-нуклеазного анализа и обработка термическим лизисом клинических образцов с последующим экстрагированием ДНК с помощью магнитных частиц, дал наиболее чувствительный и практически производительный протокол для надежного обнаружения *C. fetus subsp. venerealis* в диагностических лабораториях.

Ключевые слова: диагностика, кампилобактериоз крупного рогатого скота, ДНК, оценка качества, спектрофотометрический метод, аналитическая характеристика.

Введение

Кампилобактериоз - инфекционная болезнь животных и человека, вызываемая патогенными микроорганизмами рода *Campylobacter*, характеризующаяся у крупного рогатого скота и овец - абортами, частыми перегулами и временным бесплодием.

Основной источник возбудителя инфекции при кампилобактериозе крупного рогатого скота – зараженные быки-производители, у которых микроб очень долго (фактически пожизненно) сохраняется в препуциальном мешке, семенниках, придатках и выделяется со спермой, препуциальной слизью и секретом предстательной железы. У коров *C. fetus venerealis* вызывает клинические признаки половой инфекции, что может вызвать аборт [1,2,3,4,5,6,7].

При выполнении мероприятий связанных с профилактикой и ликвидацией кампилобактериоза, большое внимание уделяется диагностике. В диагностике кампилобактериоза бактериологический метод является основным. Согласно руководству Международного Бюро (МЭБ), идентификация самого возбудителя является основным предписывающим тестом [3].

Изолирование и выделение *Campylobacter spp.* является не легкой задачей, потому что они по своей природе имеют низкий коэффициент выживаемости при выделении их на питательных средах [8]. Согласно рекомендациям МЭБ, наряду с бактериологическими методами для выявления и дифференциации кампилобактерий, могут использоваться молекулярно-генетические методы, то есть ПЦР, и современная модификация ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

Материалы и методы

Для проведения исследования на кампилобактериоз крупного рогатого скота в хозяйствах Алматинской области от 59 коров с клинической картиной – перегулы, аборт, были взяты пробы влагалищной слизи в 1,5 мл пробирки эппендорф и также отдельно в 1,5 мл пробирки эппендорф - для микробиологических исследований.

Пробы биоматериалов были помещены в физиологический раствор и транспортную среду. Для селективного выделения термотолерантных кампилобактеров готовили агар Престона со специальной модифицированной добавкой (Preston, FD042, которая содержит – полимиксин В сульфат, рифампицин, триметоприма лактат, амфотерицин В. Для транспортировки и хранения кампилобактерий использовали полужидкую среду (по Вангу) и тиогликолевую среду. Для обогащения в питательные среды добавляли 5% дефибринированной крови крупного рогатого скота.

Идентификацию выделенных культур кампилобактерий проводили по культуральным, биохимическим, серологическим и патогенным свойствам возбудителя.

В качестве положительного контроля использовали коллекционные штаммы - *C. fetus subspecies venerealis* № 6829, *Campylobacter fetus subspecies jejuni* № 70.2Т.

Для постановки ПЦР образцы влажной слизи поместили в 1,5 мл пробирки Eppendorf с физиологическим раствором, которые поместили в термостат «Гном» при температуре 95⁰С на 5 минут, для инактивации и разрушения клеточной стенки микроорганизмов. В полученный клеточный дебрис добавляли 15 мкл магнитных частиц AMPureXPmagneticBeads (BeckmanCoulter). Смесь ресуспендировали 30 сек и инкубировали в течение 15 мин. Затем пробирки поместили на магнитный штатив и удалили над осадочную жидкость. К осадку внесли 200 мкл 70% этанола, несколько раз разворачивали на магнитном штативе, удалили этанол, осадок сушили в течение 2-3 мин., добавили 50 мкл элюирующего буфера, перемешали на вортексе и инкубировали 2 мин. Пробирки поместили на магнитный штатив и переносили ДНК, растворенная в элюирующем буферном растворе в чистые пробирки.

Спектрофотометрические показатели полученных препаратов ДНК (A_{260} / A_{280}) были в пределах 1,8-2,0.

Последовательности праймеров и зонда (синтезированны Applied Biosystems, Inc.) следующие:

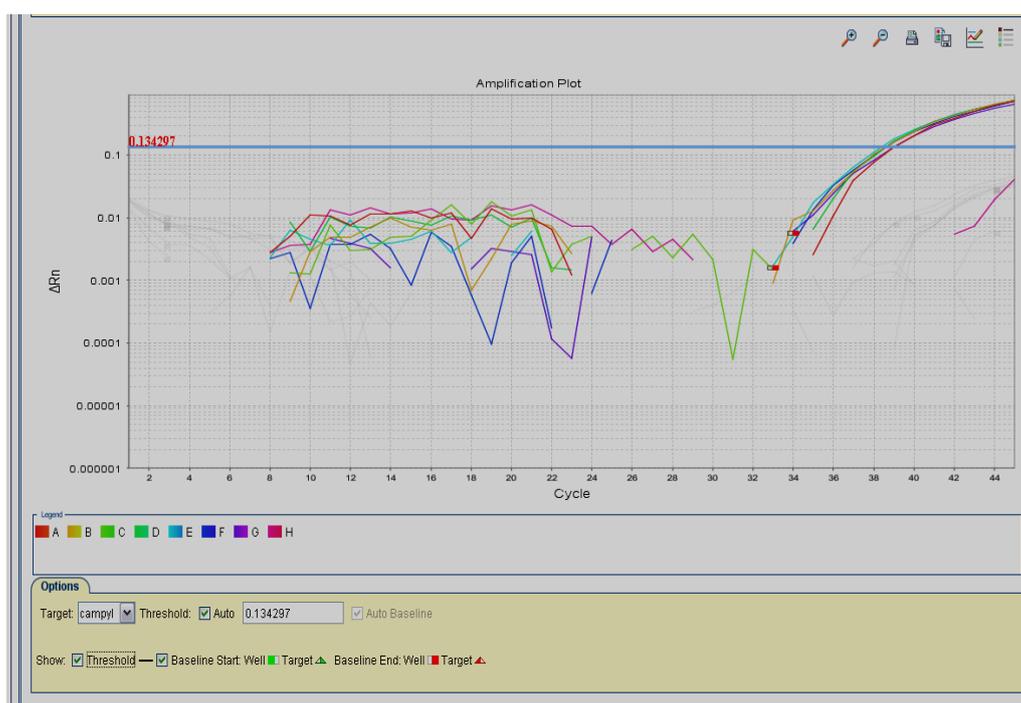
CFVF - CCCAGTTATCCCAAGCGATCT

CFVR - CGGTTGGATTATAAATTTTAGCTTGGT

CFVPI 6-FAM-CATGTTATTTAATACCGCAA

Real Time ПЦР анализ для *C. fetus subsp. venerealis* проводили в объеме 25 мкл с использованием TaqMan Universal PCR Master Mix Applied biosystems (Thermo Fisher Scientific), с 800-nM CFVF и CFVR праймерами, 150 nM CFVPI флуоресцентного 3'-МГБ-ДНК зонда и 5 мкл очищенных ДНК образцов.

Условия термоциклирования следующие на приборе Step One Plus Applied Biosystems: 50 ° С в течение 2 мин, 95 ° С в течение 2 минут , и 45 циклов – денатурация при 95 ° С в течение 20 с, отжиг при 50 ° С в течение 20 с и элонгация при 72 ° С в течение 20 с. Сигнал флуоресценции происходит в конце каждого этапа синтеза. Положительный результат был отмечен флуоресценцией, прошедшей порог 0,1.

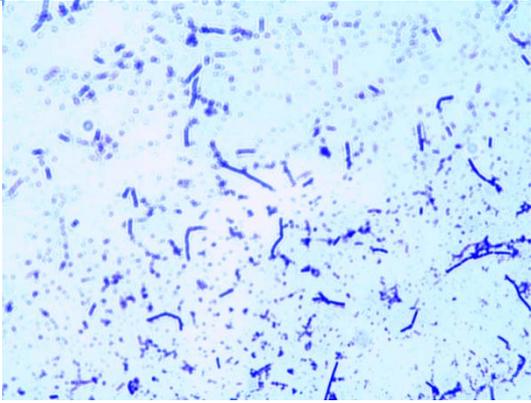
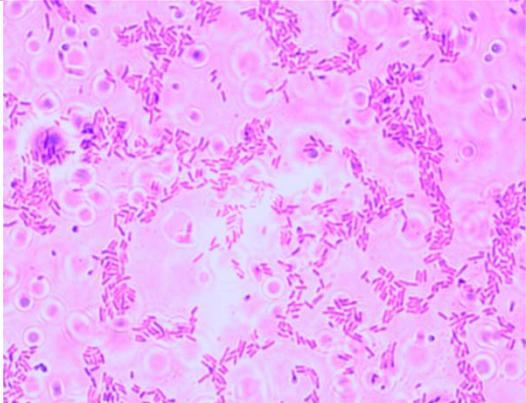


Для изучения [видового разнообразия](#) микроорганизмов в сообществе, находящихся в исследуемых биоматериалах использовали метод метагеномного исследования. Данный метод позволяет определить количество и процентное соотношение микроорганизмов без необходимости выделения и культивирования, а также взаимодействие их с внешней средой. Основным преимуществом использования метагеномного подхода является учёт не только культивируемых микроорганизмов, но и некультивируемых. Исследования проводили на секвенаторе Ion Torrent Ion S5™. Нами были отобраны образцы влагалищной слизи от коров для метагеномного секвенирования 16S рНК. Провели полную подготовку образцов согласно протоколу Ion16S™ Metagenomics. Созданные библиотеки были загружены по протоколу на 530 чип.

Результаты исследований

В результате культивирования на дифференциальных средах были выделены культуры кампилобактерий. Изучение биологических свойств характеризовалось следующим: *Campylobacter fetus* spp. *venerialis* – полиморфный микроорганизм, так в мазках из патологического материала кампилобактерии имели вид изогнутой палочки или летящей чайки (рисунок 1). Кампилобактерии имеют длину 0,5-5 мкм, ширину 0,2-0,8 мкм. Микроскопия чистой культуры выделенная с помощью селективной среды со специальной модифицированной добавкой, которая содержала – полимиксин В сульфат, рифампицин, триметоприм лактат, амфотерицин В, кампилобактерии имели форму слабоизвитых палочек (рисунок 2).

В результате микробиологических исследований биоматериала (влагалищная слизь) были выделены культуры кампилобактерий только от 8 коров, которых несколько раз безуспешно осеменяли.

	
<p>Рисунок 2. Препарат-отпечаток (окрашенный генцианвиолетом) влагалищной слизи КРС с клиническими признаками кампилобактериоза (Фото Leica DM 400B, увеличение 1000x0,25)</p>	<p>Рисунок 3. <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> с агара Престона FD042 окрашенные по Граму (Фото Leica DM 400B, увеличение 100x0,25)</p>

Campylobacter fetus venerealis высоко адаптирован к генитальному тракту крупного рогатого скота. Поэтому, очень важен правильный отбор проб и предварительная пробоподготовка клинического материала для диагностики *C. fetus venerealis* молекулярно-генетическим методом – ПЦР в реальном времени. Применение предлагаемого способа выделения ДНК для диагностики заболеваний протекающих латентно у сельскохозяйственных животных существенно облегчает труд специалистов в производственных условиях, взятие пробы влагалищной слизи у коров с помощью стерильного марлевого тампона (размером 1x1см).

При исследовании на *Campylobacter fetus venerealis* с помощью 5'-Taq-нуклеазного анализа ПЦР в реальном времени препаратов ДНК, полученных из влагалищных образцов, от КРС с воспалительными заболеваниями репродуктивных органов были обнаружены 4 коровы, которые микробиологическими исследованиями не были выявлены.

В результате метагеномного исследования было установлено, что циркуляция патогенных штаммов *Campylobacter* связана с метритом у коров, и также может иметь важное значение для развития метрита у коров после отела (рисунок 3,4).

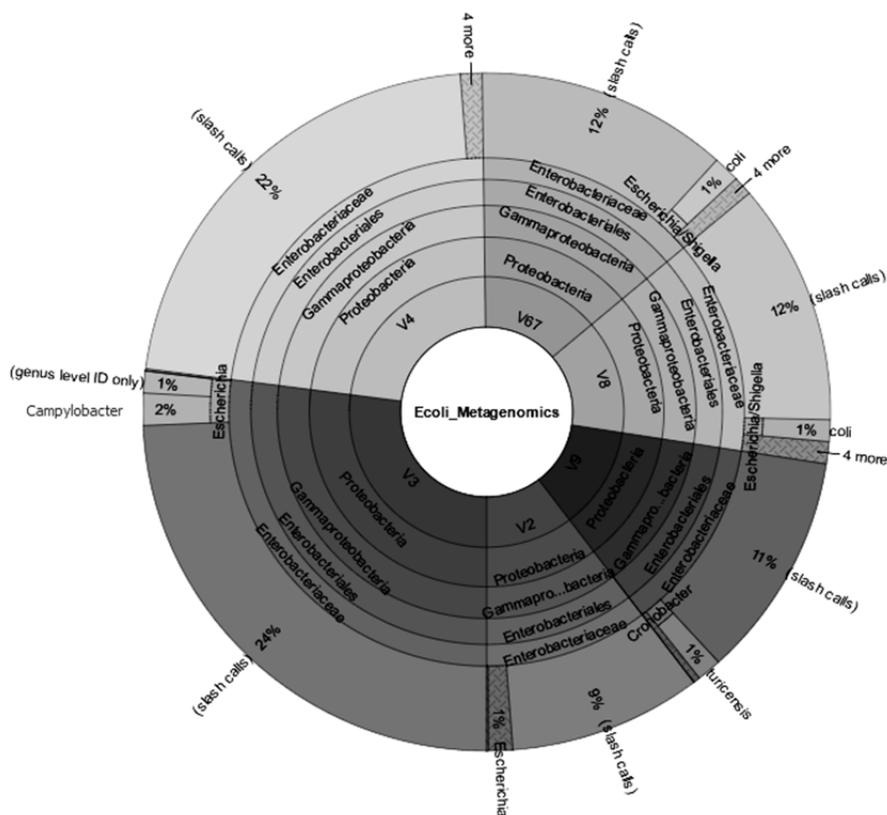


Рисунок 3. Диаграмма Крона – нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК бактерий вагинального микробиома коровы №19

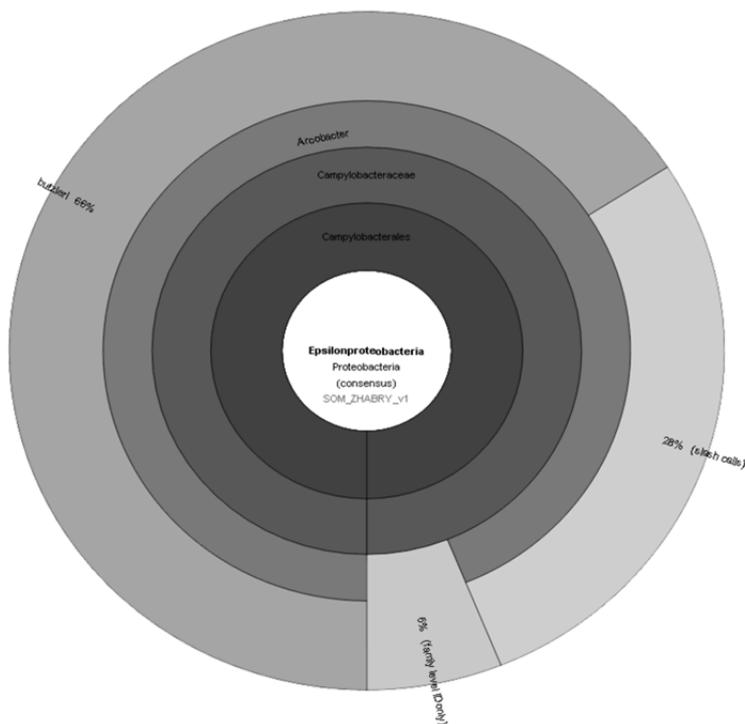


Рисунок 4. Диаграмма Крона – нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК бактерий вагинального микробиома коровы №19

Обсуждение

При кампилобактериозной инфекции крупного рогатого скота отсутствуют специфические клинические признаки, поэтому методы лабораторной диагностики играют ведущую роль в постановке этиологического диагноза. Проведенные исследования диагностики кампилобактериоза крупного рогатого скота в хозяйстве Алматинской области показали, что кампилобактериоз представлен в нозологическом профиле инфекционных болезней КРС.

Особые требования для питательных и селективных сред, а также медленный рост *C. fetus subsp. venerealis*, который подавляется другими микроорганизмами. Кампилобактерии также сохраняет ограниченную жизнеспособность при нормальных уровнях атмосферного кислорода, ограничивая выживание во время транспортировки (8,9).

Прямое ПЦР-детектирование патогенов в клинических образцах без культурального выделения все чаще применяется для диагностики заболеваний (10,11,12,13,14). Чувствительность и специфичность ПЦР Real Time снижается ингибированием в присутствии мочи, после неочищенного лизиса клеток и значительной потери чувствительности или специфичности в присутствии смегмы или слизи, включая образцы, загрязненные кровью, фекалиями или спермой [12,13,14]. Это наблюдалось в ходе проведения и этого исследования.

Применение теплового лизиса были успешно применены для выделения матричной ДНК из диагностических образцов и, таким образом, сокращает значительное время и экономию труда для рутинного выделения ДНК (15,16).

Термический лизис образцов с использованием магнитных частиц, позволило удалить потенциальные ингибирующие ПЦР вещества. Таким образом 5' Taq-нуклеазный анализ явился надежным и позволил успешно амплифицировать материал-мишень, как показано в этом исследовании. Диагностика кампилобактериоза КРС с применением 5' Taq-нуклеазного анализа и обработка термическим лизисом клинических образцов с последующим экстрагированием ДНК с помощью магнитных частиц, дал наиболее чувствительный и практически производительный протокол для надежного обнаружения *C. fetus subsp. venerealis* в диагностических лабораториях.

Проблема диагностики хронических форм кампилобактериозной инфекции определяется рядом факторов. Во-первых, различные сероварианты кампилобактерий, ответственные за развитие хронических инфекций, что затрудняет верифицировать микробиологическими методами вследствие изменений метаболизма и антигенной структуры. Во-вторых, при смешанных инфекциях затруднительно выделение возбудителя, а также малодоступен для анализа. В-третьих, иммунный ответ при хронической кампилобактериозной инфекции КРС подавлен, что ограничивает возможность использования серодиагностики.

Выбор метода исследования и способ оценки результатов при диагностике кампилобактериоза КРС имеют важное значение. Золотым стандартом является научный и комплексный подход к диагностике кампилобактериоза - подтверждение наличия возбудителя различными методами. Приоритет в диагностике кампилобактериоза принадлежит ПЦР, особенно ПЦР в реальном времени, которые могут быть использованы в качестве арбитражного подтверждающего теста и для контроля.

Анализ 5' Taq нуклеазы обеспечивает значительное превосходство по сравнению с традиционными методами диагностики культуры. Приблизительно одна клетка - мишень является достаточной для положительного результата от смегмы или шейно-вагинальной слизи.

Неравномерность территориального распространение возбудителя кампилобактериоза КРС, зависящая от численности поголовья и особенностей развития

эпизоотического процесса, требует проводить достоверную диагностику с использованием высокоспецифичных тест-систем, по результатам исследований проведены оздоровительные мероприятия, направленные на ликвидацию источника инфекции.

Литература

1. *Eaglesome M.D., Garcia M.M.* Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Vet Bull.* 1992;62:758-768.
2. *Schmidt T., Venter E.H., Picard J.A.* Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates. *Journal of the South African Veterinary Association* (2010) 81(2): 87-92 (En.). Allerton Provincial Veterinary Laboratory, Private BagX2, Cascades, 3202 South Africa. 4-9.
3. *Irons P.C., Schutte A.P., van der Walt M.L., Bishop G.C.* 2004 Genital campylobacteriosis in cattle. In Coetzer JAW, Tustin R C (eds) *Infectious diseases of livestock with special reference to southern Africa* Vol. 3 (2nd edn), Oxford University Press, Cape Town: 14591468. 7-8
4. <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdfiZ2.04.05> BGC.pdf Accessed 17 November 2009
5. Evaluation and histological examination of a *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* small animal infection model, A. Koya, S.C. de Wet, S. Turner, J. Cawdell-Smith, B. Venus, R.M. Greer, A.E. Lew-Tabor, G.B. Boe-Hansen, *Research in Veterinary Science* 99 (2015) 1–9
6. Discovery of insertion element ISCfe1: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation, Abril C., Vilei E.M., Brodard I., Burnens A., Frey J. and Miserez R., 2007, The Authors Journal Compilation 2007 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 13, 993–1000
7. The *Campylobacter* conundrum, RENDS in Microbiology Vol.9 No.8 August 2001, Keith Jones Dept of Biological Sciences, IENS, Lancaster University, Lancaster, UK LA1 4YQ
8. *Campylobacter* genotypes from food animals, environmental sources and clinical disease in Scotland 2005/6, Samuel K. Sheppard, John F. Dallas, Marion MacRae, Noel D. McCarthy, E.L. Sproston, F.J. Gormley, Norval J.C. Strachan, Iain D. Ogden, Martin C.J. Maiden, Ken J. Forbes, *International Journal of Food Microbiology* 134 (2009) 96–103
9. A seven-year survey of *Campylobacter* contamination in meat at different production stages in Belgium, Y. Ghafir, B. China, K. Dierick, L. De Zutter, G. Daube, *International Journal of Food Microbiology* 116 (2007) 111–120
10. *Hosseinzadeh, S; Kafi, M and Pour-Teimouri, M.* (2013). Detection of *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in smegma samples collected from dairy cattle in Fars, Iran, using PCR. *Vet. Res. F.*, In Press.
11. *Hum, S., Brunner J., McInnes A., Mendoza G., and Stephens J.* 1994. Evaluation of cultural methods and selective media for the isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from cattle. *Aust. Vet. J.* 71:184-186.
12. *Monke, H.J., Love B.C., Wittum T.E., Monke D.R., and Byrum B.A.* 2002. Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J. Vet. Diagn. Investig.* 14:35-39.
13. *Muller, W., Hotzel H., and Schulze F.* 2003. Identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies by PCR. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 110:55-59. (In German.)
14. *Nogva H.K., Bergh A., Holck A., and Rudi K.* 2000. Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter*

jejuni. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4029-4036.

15. *On, S.L.W., and Harrington C.S.* 2001. Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. J. Appl. Microbiol. 90:285-293.

16. *Qi, Y., Patra G., Liang X., Williams L.E., Rose S., Redkar R.J., and DelVecchio V.G.* 2001. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. Appl. Environ. Microbiol. 67:3720-3727.

Жансеркенова О.О., Касымбекова Ш.Н., Усенбеков Е.С., Анарбаева А.С.

ПЦР ДИАГНОСТИКА В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Аннотация

При диагностике кампилобактериоза КРС приоритет принадлежит ПЦР, особенно ПЦР в реальном времени.

Ключевые слова: диагностика, кампилобактериоз крупного рогатого скота, ДНК, оценка качества, спектрофотометрический метод, аналитическая характеристика.

Жансеркенова О.О., Касымбекова Ш.Н., Усенбеков Е.С., Анарбаева А.С.

НАҚТЫ УАҚЫТ РЕЖИМІНДЕГІ ПТР АРҚЫЛЫ ІРІ ҚАРА МАЛДЫҢ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗЫН ДИАГНОСТИКАЛАУ

Аңдатпа

Ірі қара малдың кампилобактериозын диагностикалау әдістерінің ішінде ПТР басымдылыққа ие болып табылады, әсіресе нақты уақыт режиміндегі ПТР.

Түйін сөздер: диагностика, ірі қара мал кампилобактериозы, ДНК, сапаны бағалау, спектрофотометрлік әдіс, аналитикалық сипаттама.

УДК 619:636:4616

Жолдасбекова А.Е., Бияшев К.Б., Бияшев Б.К., Сарыбаева Д.А.

Казахский национальный аграрный университет

ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ИСПЫТАНИЯ ВАКЦИНЫ ИЗ АТТЕНУИРОВАННОГО ШТАММА *SALMONELLA DUBLIN 31*

Аннотация

В данной статье приведены результаты производственных испытаний вакцины аттенуированного из штамма *Salmonella dublin 31*. Производственные испытания проводились в Алматинской области в 2014-2017 г.г.

Ключевые слова: аттенуированный штамм, *Salmonella dublin*, КОЕ.

Введение

Сальмонеллез занимает одно из ведущих мест среди кишечных инфекций, несмотря на значительные усилия по борьбе с ним. Особую остроту проблеме придает полипатогенность возбудителя - его опасность и для человека, и для животных и птиц, которые являются резервуаром для сальмонелл [1].