

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА В ПАТОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

*Аникевич Н.Ю., **Кучвальский М.В., **Притыченко А.Н.

**РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С. Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

*Белорусский государственный университет,
г. Минск, Республика Беларусь

Целью исследования стало изучение практического использования полимеразной цепной реакции для видовой идентификации возбудителя туберкулезной инфекции. В ходе исследования возбудитель туберкулеза был обнаружен в патологическом материале от оленя микробиологическим методом и в ПЦР.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, окраска по Киньону, идентификация микобактерий в ПЦР.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF TUBERCULOSIS MYCO- BACTERIA IN PATHOLOGICAL MATERIAL

*Anikevich N.Y., **Kuchvalski M.V., **Pritychenko A.N.

*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

**Institute of Experimental Veterinary Medicine named after S. N.
Vyshellessky, Minsk, Republic of Belarus

The aim of the research was to study the practical use of the polymerase chain reaction method for species identification of tuberculosis infectious agent. In research, the tuberculosis infectious agent deer was detected in pathological material from deer by the microbiological method and the PCR method.

Key words: tuberculosis mycobacteria, Kinyoun staining, PCR mycobacterial identification.

Введение. В медицине и ветеринарии туберкулез все еще остается глобальной проблемой. Туберкулез у человека и крупного рогатого скота вызывают два опасных патогенных вида микобактерий – *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis*. Оба этих вида крайне устойчивы к факторам внешней среды и могут довольно долго оставаться жизнеспособными в организме, при этом не вызывая клинического проявления болезни [1].

Неотъемлемой частью борьбы с распространением туберкулеза является своевременная и достоверная диагностика, основанная на обнаруже-

нии возбудителя в пораженных тканях, органах или биологических жидкостях пациента и его последующей идентификации. Существует множество различных способов лабораторной диагностики туберкулеза: микроскопический, бактериологический, серологический, биологический и молекулярно-генетический. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является экспресс-методом, обладая высокой чувствительностью, позволяя обнаружить даже единичные клетки или фрагменты ДНК в материале [2; 3].

Цель исследования: обнаружить и идентифицировать возбудитель туберкулеза в патологическом материале.

Материалы и методы исследований. Исследования были проведены в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии имени С. Н. Вышелеского». Для работы были отобраны кусочки легкого и лимфоузла с выраженными туберкулезными изменениями от оленя и приготовлены препараты-отпечатки. Препараты были окрашены по Киньону. Из патологического материала выделили ДНК с помощью набора «РИБО-преп» (Amplisens, Россия). ПЦР проводили с праймерами к локусу RD4, специфичному только для *Mycobacterium bovis* [4]. Результаты амплификации учитывали методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Результаты исследований. При микроскопировании окрашенных по Киньону препаратов из патологического материала были обнаружены палочковидные кислотоустойчивые бактерии (рисунок 1, стрелки).

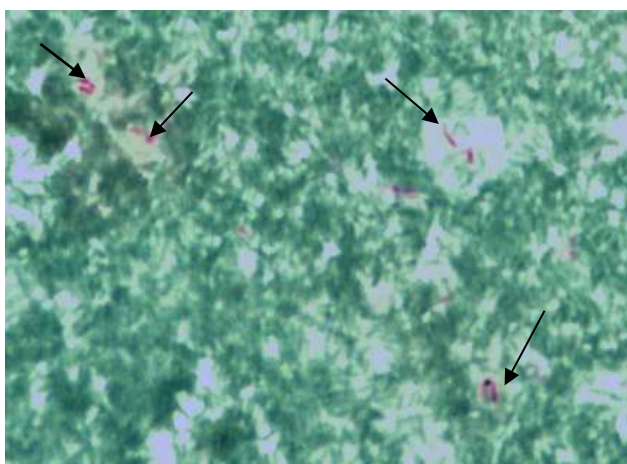


Рисунок 1 - Препарат-отпечаток лимфоузла (окраска по Киньону) x1000

При визуализации продуктов ПЦР в геле (рисунок 2) было установлено, что ДНК выделенная из ткани легкого (дорожка 4) давала четкий положительный результат. Положительный результат с меньшей интенсивностью давала ДНК, выделенная из лимфоузлов (дорожка 3). В качестве отрицательных контролей использовали контроль выделения (дорожка 2) и ДНК *M. avium* (дорожка 5, проверка праймеров на специфичность). Положительным контролем выступила ДНК, выделенная из *M. bovis* (дорожка 6).

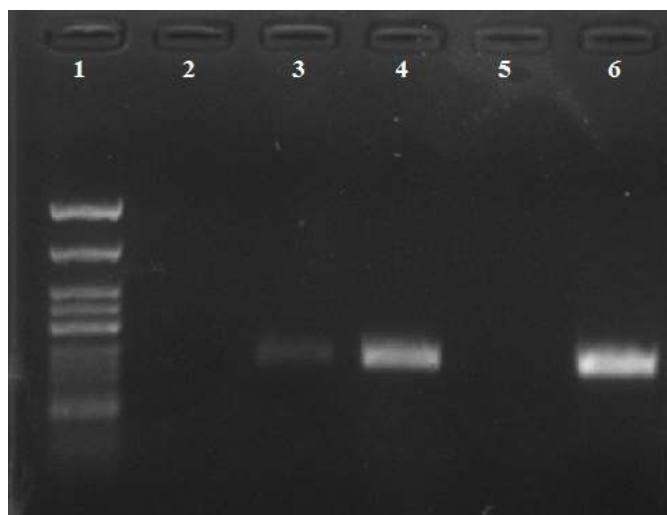


Рисунок 2 – Электрофореграмма ампликонов ПЦР: 1 –Маркер молекулярной массы, 2 – отрицательный контроль выделения, 3 – ДНК, выделенная из лимфоузла, 4 – ДНК, выделенная из кусочка легкого, 5 – ДНК *M. avium*, 6 – ДНК *M. bovis*

Заключение.

1. Из исследуемого патологического материала оленя, были выделены кислотоустойчивые бактерии. В полимеразной цепной реакции была проведена идентификация возбудителя туберкулеза – *Mycobacterium bovis*.

2. Применение полимеразной цепной реакции для идентификации микобактерий туберкулеза позволяет сократить время проведения исследований и повысить чувствительность результатов до 100%.

3. В перспективе возможно разработать тест-систему на основе нескольких пар праймеров к локусам, специфичным для *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* и нетуберкулезных микобактерий, с целью видовой дифференциации микобактерий.

Литература 1. Лысенко, А. П. Туберкулез. / А. П. Лысенко, И. И. Румачик, Т. А. Агеева // *Болезни сельскохозяйственных животных* / П. А. Красочко [и др.]; науч. ред. П. А. Красочко. – Мн.: Бизнесофсет, 2005. – С. 104–109. 2. Молекулярные методы исследования в диагностике туберкулеза / Т. В. Гребенникова [и др.] // *Ветеринарная патология*. – 2004. – № 1–2. – С. 92–93. 3. Притыченко А.Н. Фено - и генотипическая характеристика производственных штаммов *Mycobacterium bovis* 8 и *Mycobacterium bovis* Vallee // *Ученые записки : [сборник научных трудов] : научно-практический журнал / УО ВГАВМ*. – Витебск, 2010. – Т. 46, вып. 2. – С. 175–178. 4. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. / Sales, M. L. [et al.] // *Folia Microbiologica*. – 2014. – Vol. 59, № 5. – P. 433–438.