УДК 619:579.873.21:636.2(470.41)

https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-354-11-12-32-35

Краткий обзор/Brief review

Камалиева Ю.Р., Мингалеев Д.Н., Равилов Р.Х.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», 420029, РТ, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 35 E-mail: yuliya_fayzullina@mail.ru

Ключевые слова: нетуберкулезные микобактерии, лимфатические узлы, идентификация, крупный рогатый скот, ПЦР-РВ, электрофоретическая детекция

Для цитирования: Камалиева Ю.Р., Мингалеев Д.Н., Равилов Р.Х. Идентификация микобактерий нетуберкулезного типа, изолированных от крупного рогатого скота в Республике Татарстан. Аграрная наука. 2021; 354 (11-12): 32-35.

https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-354-11-12-32-35

Конфликт интересов отсутствует

Yuliya R. Kamalieva, Danil N. Mingaleev, Rustam Kh. Ravilov

Federal State Budgetary Educational Institution of High Education "Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman", 420029, Republic of Tatarstan, Kazan, Sibirskiy trakt str., 35 E-mail: yuliya_fayzullina@mail.ru

Key words: non-tuberculosis mycobacteria, lymph nodes, identification, cattle, Real-time PCR, electrophoretic detection

For citation: Kamalieva Y.R., Mingaleev D.N., Ravilov R.Kh. Identification of non-tuberculosis mycobacteria isolated from cattle in the Republic of Tatarstan. Agrarian Science. 2021; 354 (11-12): 32-35. (In Russ.)

https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-354-11-12-32-35

There is no conflict of interests

32

Идентификация микобактерий нетуберкулезного типа, изолированных от крупного рогатого скота в Республике Татарстан

РЕЗЮМЕ

Целью данной работы явилась идентификация микобактерий нетуберкулезного типа, изолированных от крупного рогатого скота в Республике Татарстан. В статье приведен результат идентификации микобактерий нетуберкулезного типа в пробах патологического материала, полученного от реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и с электрофоретической детекцией. В ходе проведенных исследований нами установлено, что в 43% исследованных проб патологического материала, полученного от реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота, были идентифицированы микобактерии нетуберкулезного типа.

Identification of non-tuberculosis mycobacteria isolated from cattle in the Republic of Tatarstan

ABSTRACT

The purpose of this work was to identify non-tuberculosism ycobacteria isolated from cattle in the Republic of Tatarstan. The article presents the results of identification of non-tuberculosis mycobacteria in samples of pathological material received from cattle reacting to tuberculin by polymerase chain reaction in real time and with electrophoretic detection. In the result of our research it is determined that in 43% of the explored samples of pathological material received from reacting to tuberculin cattle nontuberculous mycobacteria were identified.

Поступила: 22 октября После доработки: 31 октября Принята к публикации: 10 ноября Received: 22 October Revised: 31 October Accepted: 10 November

Введение

В последние годы во многих благополучных регионах стала более очевидной проблема парааллергических реакций, обусловленных циркуляцией в стадах крупного рогатого скота так называемых атипичных микобактерий и других патогенов, которые вызывают аллергические реакции на ППД туберкулин [1]. Эти реакции зачастую носят массовый характер и затрудняют оценку инфекционного статуса исследуемых животных, что во многих случаях приводит к преждевременному убою здорового продуктивного скота, нанося тем самым огромный экономический ущерб, который связан с потерями от недополучения приплода, молока, мяса и другой продукции, а также от вынужденного выполнения ряда дополнительных диагностических исследований, доставляя тем самым значительный материальный ущерб, который зачастую превышает в десятки раз ущерб от туберкулеза [2]. Так, в благополучных хозяйствах РФ выявляется в 5,3 раза больше реагирующих на туберкулин животных, чем в неблагополучных по туберкулезу [3].

На сегодняшний день в ветеринарной практике для дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота используют официально утвержденные прижизненные методы (симультанная с комплексным аллергеном из атипичных микобактерий — КАМ, пальпебральная, глазная и внутривенная пробы с ППД-туберкулином), а также послеубойные методы (патологоанатомический, гистологический, бактериологический, биопроба на лабораторных животных, молекулярно-генетический — ПЦР и др.) [4, 5, 6]. Достоинства полимеразной цепной реакции заключаются в высокой специфичности, быстром получении результатов анализа и возможности обнаружения единичных микобактериальных клеток в клиническом материале [7, 8, 9, 10].

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы явилась идентификация микобактерий нетуберкулезного типа, изолированных от крупного рогатого скота в Республике Татарстан. В связи с поставленной целью были выдвинуты следующие задачи:

- 1) выделить ДНК микобактерий из проб патологического материала;
- 2) провести идентификацию микобактерий туберкулезного типа методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием коммерческих тест-систем из проб патологического материала, полученного от реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота;
- 3) провести идентификацию микобактерий нетуберкулезного комплекса методами полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией из проб патологического материала, полученного от реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота.

Методика

Работа выполнена в 2018–2021 гг. на кафедре эпизоотологии и паразитологии, в межкафедральной лаборатории иммунологии и биотехнологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и двадцати восьми животноводческих хозяйствах различных форм собственности Республики Татарстан.

Перед постановкой полимеразной цепной реакции выделяли ДНК с помощью комплекта реагентов «ДНК-

Сорб-С-М», следуя данному протоколу фирмы-производителя (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадвора. Россия).

Полученный от реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота патологический материал (лимфатические узлы) из благополучных по туберкулезу животноводческих предприятий Республики Татарстан измельчали стерильными инструментами на кубики размерами 1–1,5×1–1,5 см, помещали в ступку, добавляли стерильный натрия хлорид 0,9%, стерильный песок и гомогенизировали с помощью пестика.

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе АНК-32 (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия). Реакционная смесь для ПЦР-РВ имела следующий состав (на 1 исследование):

- фермент Таq-ДНК-полимераза (0,5 мкл),
- буфер, содержащий хлорид магния (1,5 мкл),
- дезоксинуклеотидтрифосфаты (0,3 мкл),
- олигонуклеотидные праймеры (0,5 мкл каждого праймера 10 пмоль),
 - зонд (0,5 мкл 10 пмоль),
 - выделенную ДНК (10 мкл),
- деионизированную воду до получения объема одной пробы, равного 15 мкл в программируемом амплификаторе.

Перед началом постановки реакции все необходимые компоненты реакции размораживали и встряхивали на шейкере. Устанавливали пробирки в амплификатор для постановки ПЦР-РВ, отмечали в программе расположение и характеристику проб, выбирали рабочий краситель и устанавливали в программе температурно-временной профиль реакции.

ПЦР в режиме реального времени проводилась в следующих условиях: 95 °C — 3 мин, 95 °C — 15 с, 60 °C — 30 с — 5 повторов; 95 °C — 15 с, 60 °C — 30 с — детекция — 40 повторов, 72 °C — 30 с — 1 повтор.

Переместив пробирки в отдельный штатив, выполняли электрофоретическую детекцию продуктов амплификации в агарозном геле. В соответствии с требованиями работа с амплифицированной ДНК выполнялась в отдельном помещении.

Приготовление рабочего электрофорезного буфера проводили в соответствии с инструкцией к набору ЭФ-200 (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Результаты анализа продуктов ПЦР в режиме реального времени интерпретировали на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Сt» (англ. threshold cycle — пороговый цикл) в соответствующей графе в таблице результатов реакции, выведенной в результате машинного анализа. Образец считался положительным, если значение Сt не более 35. Образец считался отрицательным на наличие маркерной ДНК, если для него значение Сt отсутствовало или составляло более 37.

Учет результатов анализа с электрофоретической детекцией проводили по наличию или отсутствию специфической полосы амплифицированной ДНК на электрофореграмме. Положительными считались образцы, которые содержали специфическую светящуюся полосу на уровне, соответствующем размеру искомого ампликона. Отрицательными считались образцы, в дорожках которых отсутствовала специфическая светящаяся полоса на уровне, соответствующем размеру искомого ампликона.

Результаты

Выделенные из 100 проб патологического материала ДНК подвергли исследованиям на идентификацию микобактерий туберкулезного типа с использованием коммерческих тест-систем «МТБ-КОМ» для выявления ДНК Mycobacterium tuberculosis complex и тест-систем «МТБ-ДИФ» для выявления и дифференциации Mycobacterium bovis и Mycobacterium tuberculosis производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва. В результате проведения ПЦР-РВ 100 проб патологического материала микобактерии туберкулезного комплекса не выявлены и результат также подтверждается лабораторными данными из государственного бюджетного учреждения «Республиканская ветеринарная лаборатория» Республики Татарстан.

Дальнейшие исследования заключались в постановке полимеразной цепной реакции с использованием разработанного нами высокоспецифичного набора олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации нетуберкулезных микобактерий с целью дифференциации неспецифических реакций на туберкулин у крупного рогатого скота. Данный набор рассчитан на идентификацию в пробах материала Mycobacterium kansasii, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium intracellulare. Mycobacterium avium, Mycobacterium scrofulaceum.

Проведя цикл исследований по идентификации микобактерий нетуберкулезного комплекса из 100

проб патологического материала методами полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией, полученного от реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота, ДНК микобактерий были идентифицированы в 43 пробах патологического материала, что составило 43% от общего количества исследованных проб.

Результаты идентификации нетуберкулезных микобактерий в Республике Татарстан представлены в та-

Как видно из таблицы 1, видовое разнообразие нетуберкулезных микобактерий в Республике Татарстан представлено Mycobacterium kansasii, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium avium, Mycobacterium scrofulaceum. Mycobacterium smegmatis не была обнаружена ни в одной из проб патологического материала.

Mycobacterium kansasii выделена в 6 хозяйствах, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis — в 2, Mycobacterium smegmatis — ни в одном, Mycobacterium fortuitum — в 7, Mycobacterium intracellulare — в 4, Mycobacterium avium — в 4, Mycobacterium scrofulaceum — в 6.

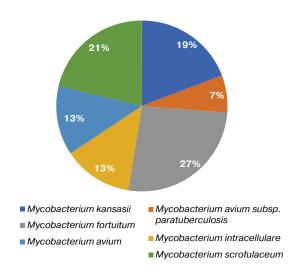
Таблица 1. Нетуберкулезные микобактерии, идентифицированные в животноводческих хозяйствах Республики Татарстан

Table 1. Non-tuberculosis mycobacteria identified in livestock farms of the Republic of Tatarstan

Nº n/n	Наименование хозяйства	Mycobacterium kansasii	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis	Mycobacterium smegmatis	Mycobacterium fortuitum	Mycobacterium intracellulare	Mycobacterium avium	Mycobacterium scrofulaceum
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	ООО «Кичучат», Альметьевский район							+
2	АО «Токарликова», Альметьевский район	+						
3	ООО СХП «Свияга» МТФ «Давлике- ево», Апастовский район		+		+	+	+	+
4	А/ф «Заинский сахар» МТФ «Сава- леево», Заинский район							+
5	МТК «Зай» МТК «Куш Елга», Заин- ский район	+			+	+	+	+
6	ООО «Ак Барс Дрожжаное» филиал «Большая Акса», Дрожжа- новский район				+			
7	ООО «Ак Барс Дрожжаное» филиал «Матаки», Дрожжановский район	+						
8	ООО «Ак Барс Дрожжаное» филиал «Новое Ильмово», Дрож- жановский район		+		+			
9	ООО« Калмурзино», Мензелинский район	+			+	+	+	+
10	ООО «Агро-Основа», Новошеш- минский район				+			
11	А/ф «Сарман», Сармановский район	+			+	+	+	+
12	ООО АПК «Биклянь», Тукаевский район	+						
13	Всего	6	2	0	7	4	4	6

Рис. 1. Видовой состав и процентное соотношение микобактерий. идентифицированных в патологическом материале, полученном от реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота в Республике Татарстан

Fig. 1. Species variety and percentage of mycobacteria identified in pathological material obtained from tuberculin-responsive cattle in the Republic of Tatarstan



43 пробы патологического материала, в которых идентифицированы микобактерии, были получены из 12 хозяйств 8 районов Республики Татарстан: Альметьевский, Апастовский, Заинский, Дрожжановский, Мензелинский, Новошешминский, Сармановский, Тукаевский.

Удельный вес видового разнообразия нетуберкулезных микобактерий, выделенных в Республике Татарстан, отражен на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1, *Mycobacterium kansasii* идентифицирована в 19 пробах патологического материала, что составило 34,5% от общего количества исследованных проб, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* — в 7 пробах патологического материала (12,7%), *Mycobacterium fortuitum* — в 26 пробах патологического материала (47,3%), *Mycobacterium intracellulare* и *Mycobacterium avium* — в 13 пробах патологического материала (23,6%), *Mycobacterium scrofulaceum* — в 21 пробе патологического материала (38,2%).

Выводы

На основании проведенных нами исследований методами полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией установлено, что в 43% исследованных проб патологического материала, полученного от реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота из 12 хозяйств 8 районов Республи-

ки Татарстан, были идентифицированы микобактерии нетуберкулезного типа. Видовой состав идентифицированных микобактерий представлен Mycobacterium kansasii, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium avium, Mycobacterium scrofulaceum.

В Республике Татарстан неспецифические реакции на туберкулин регистрируются как в благополучных, так и в неблагополучных по туберкулезу крупного рогатого скота хозяйствах. Поскольку отсутствует эффективный метод дифференциации, такие реакции учитываются как специфические, и выявленные животные в большинстве случаев отправляются на убой. Такая ситуация продолжается многие годы, вызывая необоснованные затраты на проведение противоэпизоотических мероприятий. Лабораторными методами диагностики подтверждается или опровергается наличие в патологическом материале микобактерий только туберкулезного комплекса. Поэтому для сельскохозяйственных предприятий актуальным остается вопрос установления причины возникновения неспецифических реакций на туберкулин. Наши практические наблюдения свидетельствуют о возможности, в определенных условиях, проведения дополнительной дифференциальной диагностики с помощью разработанного нами набора олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации микобактерий нетуберкулезного типа, которые являются причиной проявления парааллергических реакций в стадах.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- 1. Макарова М.В., Гунтупова Л.Д. Нетуберкулезные микобактерии. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2020;20(2):97–102. [Makarova M.V., Guntupova L.D. Nontuberculous mycobacteria. Journal BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2020;20(2):97–102 (In Russ.)] https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-97-102
- 2. Ощепков В.Г., Кощеев Н.Н. Новый перспективный аллерген (НРА) для диагностики туберкулеза у животных. Достижения науки и техники АПК. 2015;29(10): 91-94. [Oschepkov V.G., Koscheev N.N. A new promising allergen (NPA) for the diagnosis of tuberculosis in animals. Achievements of science and technology of AIC. 2015;29(10): 91-94 (In Russ.)]
- 3. Помыканов НП. Совершенствование диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в индивидуальных и общественных хозяйствах: Автореф. дис. канд. вет. наук. Москва: ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ). 2005. 3 с. [Pomikanov NP. Improving the diagnosis of bovine tuberculosis in individual and public farms: Autoref. of diss. of cand. of vet. sciences. Moscow: SSI Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Y.R. Kovalenko. 2005. 3 p. (In Russ.)]
- 4. Донченко АС, Овдиенко НП, Донченко НА. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота. Новосибирск. 2004. С. 309. [Donchenko AS, Ovdienko NP, Donchenko NA. Diagnostics of Bovine Tuberculosis. Novosibirsk. 2004. 309 p. (In Russ.)]
- 5. Кощеев Н.Н., Бордюг В.Ф., Ощепков В.Г., Панкратова А.Д., Слепченко А.Д. Новый способ определения сенсибилизирующих свойств атипичных микобактерий. *Инфекционная патология животных: Мат. Международ. конф.* 2011; 102-105. [Koscheev N.N., Bordyug B.F., Oschepkov V.G., Pankratova A.D., Slepchenko A.D. A new method for determining the sensitizing

ОБ АВТОРАХ:

Камалиева Юлия Ринатовна, аспирант

Мингалеев Данил Наильевич, доктор ветеринарных наук, доцент, заведующий кафедрой эпизоотологии и паразитологии, проректор по учебно-воспитательной работе

Равилов Рустам Хаметович, доктор ветеринарных наук, профессор, ректор

properties of atypical mycobacteria. *Infectious pathology of animals: Mat. of International Conf.* 2011; 102-105 (In Russ.)]

- 6. Лямин А.В., Исматуллин Д.Д., Жестков А.В., Ковалев А.М., Барышникова Л.А., Неняйкин С.С. Сравнительный анализ методов идентификации нетуберкулезных микобактерий, выделенных из клинического материала. Инфекция и иммунитет. 2017.7(3):285–291. [Lyamin A.V., Ismatullin D.D., Zhestkov A.V., Kovalyov A.M., Baryshnikova L.A., Nenjajkin S.S. Comparative analysis of methods for identification of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical material. Russian Journal of Infection and Immunity. 2017.7(3):285–291 (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-285-291
- 7. Елисеев ПИ. Роль молекулярно-генетических методов в повышении эффективности диагностики туберкулеза с лекарственной устойчивостью микобактерий и микобактериозов: Автореф. дис. канд. мед. наук. Санкт-Петербург: ГБУВ ВПО «Северный государственный медицинский университет» МЗ РФ. 2013. 23 с. [Eliseev PI. The role of molecular genetic methods in improving the effectiveness of the diagnosis of tuberculosis with drug-resistant mycobacteria and mycobacterioses: Autoref. of diss. of cand. of med. sciences. Saint-Petersburg: SBIV HPE "North State Medical University" MH RF. 2013. 23 p. (In Russ.)]
- 8. Springer B, Stockman L, Tescher K, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic method *Journal of Clinical Microbiology*. 1996;34:296–303.
- 9. O'Donnell N., Corcoran D., Lucey B., Barrett A. Molecular-based mycobacterial identification in a clinical laboratory setting: a comparison of two methods. *British Journal of Biomedical Science*. 2012.69(4):164-168.
- 10. Bwanga F., Hoffner S., Haile M., Joloba M. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: A meta-analysis. *Journal BMC Infectious Diseases*. 2009.9(67):15.

ABOUT THE AUTHORS:

Kamalieva Yulia Rinatovna, postgraduate student
Mingaleev Danil Nailievich, Doctor of Veterinary Sciences,
Associate Professor, Head of the Department of Epizootology and
Parasitology, Vice-Rector for Teaching and Educational Work
Ravilov Rustam Khametovich, Doctor of Veterinary Sciences,
Professor, Rector