

Министерство образования и науки Кыргызской Республики

**Кыргызский национальный аграрный университет
имени К.И. Скрябина**

Диссертационный совет Д.06.14.489

На правах рукописи
УДК 619:616.98:579.841.93Б

ЧЕГИРОВ САЛАМАТ БИРИМКУЛОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
БРУЦЕЛЛЫ МЕЛИТЕНЗИС И БРУЦЕЛЛЫ АБОРТУС В
КЫРГЫЗСТАНЕ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

БИШКЕК – 2015

Диссертационная работа выполнена в лаборатории по изучению бруцеллеза с.х. животных и научно-экспериментальной базе Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А.Дуйшеева, Жайылском государственном межрайонном центре ветеринарной диагностики.

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, член-корр.
НАН КР., профессор
Нургазиев Рысбек Зарылдыкович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Доолеткельдиева Тинатин Доолеткельдиевна

кандидат ветеринарных наук, с.н.с.
Джетигенов Эльмурат Алсеитович

Ведущая организация: Институт биотехнологии НАН КР.

Защита диссертации состоится «27» февраля 2015 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета Д.06.14.489 при Кыргызском национальном аграрном университете имени К.И. Скрябина по адресу: 720005, г.Бишкек, ул. О. Медерова, 68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина по адресу: 720005, г.Бишкек, ул. О. Медерова, 68.

Автореферат разослан «26» января 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук



Е.Д.Крутская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Факторами, сдерживающими развитие общественного и частного животноводства, являются инфекционные болезни, среди которых важное место занимает бруцеллез. Данная болезнь животных, являясь одной из наиболее распространенных среди животных, причиняет большой экономический ущерб животноводству, имеет негативное социальное значение. В Кыргызской Республике сохраняется довольно сложная эпизоотическая и эпидемическая ситуация по бруцеллезу и особенно в ряде южных регионов.

Успешное решение проблемы оздоровления от бруцеллеза возможно только при внедрении в ветеринарную практику научно обоснованной системы мероприятий с использованием эффективных средств и методов диагностики и специфической профилактики болезни. Актуальность решения проблемы возрастает в последнее время в связи с изменением форм ведения сельского хозяйства, расширением внешних торговых, экономических связей (Иванов А.В. с соавт., 2009).

Важное место в комплексе противобруцеллезных мероприятий занимает специфическая профилактика (Иванов А.В. с соавт., 2008; Иванов А.В. с соавт., 2012). В последние годы в нашей стране широко используется вакцина из штамма Rev-1. В ряде мест ее применение способствовало достижению определенных успехов в борьбе с бруцеллезом мелкого рогатого скота.

Основой успешной борьбы с бруцеллезом является ранняя диагностика и типизация возбудителя. Особенности течения бруцеллезной инфекции, несмотря на многообразие применяемых средств и методов диагностики, не позволяют при однократном исследовании выявить всех больных бруцеллезом животных. Традиционно применяемые диагностические методы не позволяют оперативно дифференцировать бруцеллы на уровне видов и штаммов, что затрудняет проведение эпизоотологического и эпидемиологического анализа и снижает эффективность использования средств специфической профилактики бруцеллеза.

Для диагностических исследований типов бруцелл крайне важно знать их молекулярно-биологические различия в молекулярной массе, генетической структуре, изменчивости бруцелл под действием внешних факторов.

Широкое применение в ветеринарной практике антибиотиков и дезосредств, массовая вакцинация животных способствовали изменению форм бруцелл, в частности R- и L-форм. Определение принадлежности таких атипичных культур к роду *Brucella*, а также их дифференциация от антигенно родственных микроорганизмов и других видов по общепринятым методикам весьма трудоемка и продолжительна. Следовательно, внедрение простого и надежного экспресс-метода идентификации бруцелл (в.т.ч. измененных форм), дифференциация их от фенотипически сходных микроорганизмов с использованием достижений современной

биотехнологии, в частности, определение гомологии нуклеотидных последовательностей ДНК в реакции ДНК гибридизации, является актуальной задачей ветеринарной науки.

Связь темы диссертации с основными научными программами. Научные исследования, проведенные по теме диссертации, являлись составной частью тематического плана НИР лаборатории по изучению бруцеллеза сельскохозяйственных животных Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им.А.Дуйшеева “Эпизоотический мониторинг бруцеллеза животных и его диагностика”, регистрационный номер 0006200.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы явилось совершенствование метода идентификации бруцелл с применением ПЦР технологии на основе молекулярно-биологических характеристик бруцелл, выделенных в Кыргызской Республики.

Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- установить уровень зараженности с.х. животных в регионах республики различными видами бруцелл путем проведения эпизоотологических и молекулярно генетических методик;

- определить типы возбудителя бруцеллеза на уровне видов, штаммов и биоваров;

- изучить полипептидный состав экзобелков *B.melitensis* и *B.abortus*;

- провести сравнительный анализ степени гомологии нуклеотидных последовательностей ДНК полевых штаммов (*b.melitensis* и *b.abortus*) и изолятов, выделенных из организма животных-носителей возбудителя.

Научная новизна полученных результатов:

- установлен уровень зараженности с.х. животных различными видами бруцелл по регионам республики; отмечена положительная динамика сокращения инфицированности с.х. животных бруцеллезом в результате массовой вакцинации ярок вакциной Рев1;

- установлена миграция возбудителя *B.melitensis* среди КРС и *B.abortus* среди овец;

- предложена и апробирована система видовой дифференциации бруцелл с помощью ПЦР анализа;

- проведена типизация бактерий рода бруцелл на территории Ак-Талинского района;

- установлено что применение рестриктазы Pst I позволяет проводить дифференциацию авирулентных штаммов бруцелл на основе наличия фрагментов размером 850 п.н. и вирулентных на основе наличия фрагментов ДНК размером от 550 до 10000 п.н.;

- дана генетическая характеристика выделенных штаммов бруцелл; с применением диск-электрофореза в ПААГ проведена идентификация и дифференциация видов и штаммов бруцелл;

- с применением ПЦР-ПДРФ идентифицированы *b.abortus*, *b.melitensis*, *b.ovis*.

Практическая значимость полученных результатов. Ветеринарной практике предложен более совершенный молекулярно-генетический метод эпизоотического мониторинга по бруцеллезу с определением степени зараженности животных и видов возбудителя.

Предложена система видовой дифференциации бруцелл и их идентификации с применением ПЦР-анализа как более чувствительная и менее затратная по времени.

Разработан метод ранней поствакцинальной прижизненной диагностики бруцеллеза, позволяющий своевременно выявить и изолировать инфицированных животных, предупредить перезаражение здорового стада.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- эпизоотологический мониторинг по бруцеллезу с.х. животных с применением молекулярно-генетических методик;

- типизация бактерий рода бруцелл, регистрируемых на территории Ак-Талинского района;

- дифференциальная диагностика бруцеллеза у животных, привитых вакциной из штамма Рев-1 от естественно больных бруцеллезом животных с применением ПЦР-ПДРФ (Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов);

- изучение межвидовой миграции возбудителя бруцеллеза среди с.х. животных;

- изучение эффективности конъюнктивального метода введения и эффективности вакцины Рев-1;

- использование методов оценки генотипических характеристик различных штаммов бруцелл в их идентификации и дифференциации.

Личный вклад соискателя. Автором самостоятельно изучена степень распространения бруцеллеза по регионам республики и регистрируемым видам бруцелл. Выполнена серия сложных молекулярно-генетических исследований по типизации бруцелл, их миграции между видами животных, дана биологическая характеристика выделенных штаммов бруцелл с применением ПЦР-ПДРФ и определено наличие биоваров в каждом типе бруцелл и их свойства. Сложные лабораторные исследования выполнялись под руководством д.в.н., профессора Нургазиева Р.З

Апробация полученных результатов. Основные положения диссертации доложены при обсуждении годовых отчетов лаборатории по изучению бруцеллеза с.х. животных, на межлабораторных заседаниях и ученом совете Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии имени А.Дуйшеева; Международной конференции, посвященной 95-летию со дня рождения выдающегося ученого-ветеринара, д.в.н. профессора Алдашева Абдулхая Алдашевича (г.Бишкек, 2014); Международной конференции «Проблема борьбы с бруцеллезом животных» (г.Алматы, 2014).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ в изданиях, рекомендованных ВАК КР.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах компьютерного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список использованных источников литературы, приложения.

Материалы диссертации иллюстрированы 15 таблицами и 11 рисунками. Список литературы содержит 270 наименований работ.

В главе 2 «Материала и методы исследований» дана характеристика объектов исследования и методических подходов выполнения исследований.

При анализе эпидемиологической и эпизоотической ситуации по бруцеллезу на территории Кыргызской Республики использовалась государственная статистическая отчетность ДГСН при МЗ КР за 2008-2014 гг., и данные Департамента государственной ветеринарии Кыргызской Республики, а также результаты собственных эпизоотологических исследований.

Для выявления ДНК возбудителей бруцеллеза в биологическом материале использовали набор реагентов производства России (Бру-Ком). Выделение ДНК из патологического материала проводили в соответствии с «Инструкцией по применению тест-системы «БРУ-КОМ» для выявления возбудителя бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции», утвержденной федеральными службами по ветеринарному и фитосанитарному надзору Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, от 14 июля 2009 года (организация-производитель - ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва).

Определение концентрации и степени очистки продуктов ДНК проводили на спектрофотометре "Specord M-40", анализируя спектры поглощения растворов ДНК в области 210-320 нм.

Подобие нуклеотидных последовательностей ДНК исследуемых культур определяли по реакции ДНК-ДНК гибридизации по модифицированному методу P.Denhardt (1978).

Полипептидный состав белков внешней мембраны бруцелл изучали электрофоретически по методу Laemmli U.K. (1970).

Для дифференциации штаммов бруцелл проводили генодиагностические исследования с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выделение ДНК, подготовку проб и проведение реакции ПЦР осуществляли в соответствии с разработанными ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» «Методическими рекомендациями по индикации и дифференциации отдельных видов бруцелл с использованием ПЦР» (Казань, 2011). Для постановки ПЦР праймеры сконструировали в программе Терцик.

При проведении реакции использовали Таг-полимеразу фирмы «Сиб Энзим» и олигонуклеотида фирмы «Синтол».

При изучении гуморального иммунитета применяли серологические реакции: роз - бенгал пробу (РБП) с роз - бенгал антигеном, агглютинации (РА), пассивной гемагглютинации (РПГА), связывания комплемента (РСК) и иммуноферментный анализ (ИФА) с единым бруцеллезным и R-антигеном.

При обработке результатов экспериментов использованы методы математической статистики, принятые в биологии и медицине (Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962). Цифровой материал обработан статистически по критерию Стьюдента для проверки достоверности различий. Разница между сравниваемыми величинами считалась достоверной при $p \leq 0,05$ (Лакин Г.Ф., 1990).

За основу выводов и практических предложений взяты результаты контролируемых опытов, выполненных в лабораторных и производственных условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В главе 3 «Эпизоотический и эпидемиологический мониторинг бруцеллеза в регионах республики» для выяснения исходной эпизоотической ситуации по бруцеллезу в Ак-Талинском районе перед вакцинацией ярочного поголовья нами проведен серологический мониторинг среди МРС, КРС (2008). Как установлено серологическими исследованиями, из 4023 проб от овец и коз, крупного рогатого скота, положительно реагирующих овец и коз в Ак-Талинском районе по РБТ выявлено 11,6%, среди КРС 1,6%, по ИФА соответственно 9,1 и 1,6 %.

В 2012 году спустя 4 года после начала вакцинации ярочного поголовья от крупного рогатого скота было исследовано 1027 проб сывороток крови. Из них 5 проб дали положительные результаты (0,5% против 1,6% в 2008 г.); из 982 проб крови от лошадей 5 проб были положительными (0,5%),; из 4580 проб сывороток крови от овец и коз были положительными 340 проб (7,4% против 11,6% в 2008г.). Положительные пробы сыворотки крови от КРС и МРС повторно исследованы методом ИФА.

Таблица 1 - Результаты серологического исследования животных на бруцеллез до (2008 г.) и после применения вакцины Рев 1. (2012 г.)

№	Вид животных	Исследовано проб		Из них положительных в реакциях							
				РБТ		%		ИФА		%	
		2008	2012	2008	2012	2008	2012	2008	2012	2008	2012
1	МРС	3017	4580	350	340	11,6	7,4	346	298	9,1	6,5
2	КРС	1006	1027	17	5	1,6	0,49	17	4	1,6	0,39
3	Итого	4023	5607	367	345	9,1	7,89	363	302	9	6,89

При этом из 340 положительных проб от МРС 298 подтвердили в ИФА положительный результат; Из 5 положительных проб от КРС подтвердили результат 4 пробы. Из 5 проб от лошадей 5 имели специфические антитела к возбудителю бруцеллеза. Таким образом, за 4 года массовой вакцинации ярком вакциной РевI конъюнктивальным методом число положительно реагирующих сократилось среди овец и коз с 11,6% до 6,5%, среди КРС с 1,6 до 0,4%. В целом по Ак-Талинскому району в течение 4 лет инфицированность животных сократилась с 9 до 4,7 %. Исследования показывают, что вакцинация среди овец и коз в Ак-талинском районе привела к сокращению заболеваемости бруцеллезом овец, коз и других видов животных, к сокращению числа больных бруцеллезом людей.

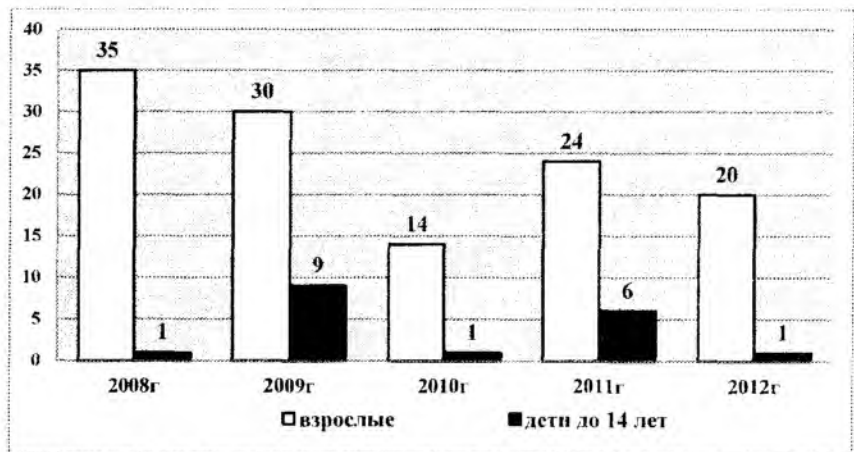


Рисунок 1 - Динамика заболеваемости бруцеллезом людей (первые выявленные случаи) в Ак-Талинском районе (абсолютное число больных).

Это свидетельствует о том, что вакцина Рев-I вызывает стойкий иммунитет у животных против заражения бруцеллезом. А оздоровление всех видов с.х. животных от бруцеллеза, позитивно сказалось на сокращении заболеваемости людей.

Определение типов возбудителя бруцеллеза, циркулирующих на территории Ак-Талинского района

Выполнено молекулярно-генетическое типирование изолятов бруцелл, выделенных от инфицированных в Ак-Талинском районе животных (МРС, КРС и лошади). Проведено типирование 307 изолятов бруцелл, выделенных от различных видов животных из 18 поселков.

Таблица 2-Молекулярно биологическое типирование бруцелл, 2012г.

№	Вид животных	Исследовано проб	Определено ПЦР анализом			
			B.melitensis		B.abortus	
1	МРС	298	285	95,6%	13	4,4%
2	КРС	4	1	25%	3	75%
3	Лошади	5	1	20%	4	80%
4	Итого	307	288	93,4%	19	6,6%

Идентификация и генотипирование в ПЦР 307 изолятов с использованием праймеров на дифференцирующие генетические маркеры на ДНК позволили отнести 288 изолятов к B.melitensis и 19 — к B.abortus. По видам животных соответственно МРС – 285 и 13; КРС 2 и 2, Лошади 1 и 4. Следовательно, преобладающим видом бруцелл является B.melitensis, а среди КРС и овец наблюдается миграция B.abortus. Подтверждена доминирующая роль бруцеллы мелитензис а также миграция B.abortus среди овец в 4,4% случаев. Всего положительных проб из числа исследованных (4580) оказалось 295, или 6,5%, что ниже исходной зараженности овец (11,6%) почти вдвое. Это результат применения вакцины РевI маточному поголовью овец.

Типизация бактерий рода бруцелла до видовой принадлежности в некоторых областях республики

В эпидемиологическом и эпизоотологическом контроле определенную роль играет знание генотипов циркулирующих штаммов бруцелл. Проводя эту работу постоянно, можно достоверно установить источники инфекции и повысить эффективность профилактических мероприятий.

Установлено, что наиболее высокая заболеваемость животных бруцеллезом отмечена в Джалал-Абадской и Чуйской областях, в основном, возбудитель козье-овечьего типа, т.е. B.melitensis. Данные области имеют общие границы и автотрассы с Китаем, Казахстаном, Узбекистаном, выше вероятность заноса инфекции в Кыргызстан. На Токмокский рынок поступают животные не только из Чуйской, но из всех областей Кыргызстана. Чуйская область является посредником между южными и северными регионами, где преобладает Br. melitensis; между восточным и северным регионами, где преобладает Br. abortus.

С применением видоспецифических праймеров выделенные бруцеллы от инфицированных животных были исследованы методом ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов). Из общего количества изолятов 843 были от МРС и 290 от КРС.

Таблица 3-Наличие типов и биоваров бруцелл в крови МРС

№	Область	Исслед. проб.	Определено ПЦР исследованием										
			V.melitensis, биовар				V.abortus, биовар						
			1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7
1	Нарынская	103	33	20	43	3	0	1	2	0	0	1	0
2	И-Кульская	120	40	20	56	3	1	0	0	0	0	0	0
3	Чуйская	98	50	34	10	0	0	1	1	0	0	2	0
4	Дж-Абадская	140	60	43	29	6	0	0	1	0	0	1	0
5	Таласская	133	42	33	52	2	0	1	1	0	0	2	0
6	Баткенская	56	12	5	35	3	1	0	0	0	0	0	0
7	Ошская	193	60	39	66	25	0	0	2	0	0	1	0
5	Итого	843	297	194	291	42	2	3	7	0	0	7	0

Из данных таблицы 3 видно, что в результате ПЦР диагностики выделенных 843 изолятов бруцелл от мелкого рогатого скота выявлено 824 (97,7%) проб относящихся к виду V.melitensis и 19 (2,3%) проб – вида V.abortus. Полученные данные подтверждают сведения о межвидовой миграции возбудителей бруцеллеза среди различных видов животных. Вид V.abortus – вызывающий бруцеллез крупного рогатого скота был выделен у овец в 19 случаях, что составляет 2,3% от числа исследованных проб.

Кроме этого анализ таблицы показывает, что V.melitensis биовары 1 и 3 чаще регистрируется в республике и преимущественно в Нарынской, Джалал-Абадской, Баткенской, Чуйской, и Иссык-Кульской областей. Биовар 1 (35,23%) чаще регистрируется в Чуйской, Джалал-Абадской и Иссык-Кульской областей. Биовар 3 (34,52%) – выявляется преимущественно в Иссык-Кульской, Нарынской и Баткенской областей. Не редко регистрируется биовар 2 (23%) и преимущественно Чуйской и Джалал-Абадской областей. Реже всего регистрируется биовар 4 (5%) и преимущественно в Ошской области. Из выделенных V.abortus у мелкого рогатого скота чаще всего выявляли биовар 3 в 7 случаях из 19 случаев носительства данного вида возбудителя.

Таблица 4 Наличие типов и биоваров бруцелл в крови КРС

№	Область	Исслед. проб.	Определено ПЦР исследованием										
			V.melitensis, биовар				V.abortus, биовар						
			1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7
1	Нарынская	40	0	0	2	0	12	2	20	1	0	3	0
2	И-Кульская	38	0	1	1	0	12	6	12	0	0	6	0
3	Чуйская	39	1	1	2	0	12	6	13	0	1	3	0
4	Дж-Абадская	52	1	1	0	0	16	8	18	2	0	6	0
5	Таласская	46	1		1		8	6	18	2	1	9	0
6	Баткенская	25	1	2	0	0	10	2	6	1	1	2	0
7	Ошская	50	1	0	0	0	16	2	19	2	1	8	1
5	Итого	290	5	5	6	0	86	32	106	8	4	37	1

Приведенные данные в таблице 4 показывают, что при типизации 290 изолятов возбудителя бруцеллеза, выделенных от крупного рогатого скота, выявлено 274 (94,4%) проб относящихся к виду V.abortus и 16 проб (5,6%) показали на наличие вида V.melitensis. Из анализируемых 7 биоваров регистрируемых в республике, чаще всего выявлялись биовары 1(29,6%), 3 (36,5%) и 6 (12,7%). Из таблицы видно, что преимущественно выделяется биовар 3. По областям биовар 3 чаще всего регистрируется в Нарынской области, что составляет 50 % от числа регистрируемых в области возбудителя V.abortus. В Ошской области данный вид биовара составляет 38%. Биовар 1 чаще регистрируется в Баткенской (40%) и Ошской (32%) областей. А биовар 6 чаще регистрируется в Таласской (19,5%), Ошской (16%) и Иссык-Кульской (15,7%) областей.

Анализ данных приведенных в таблице 4 показывают, что в республике возбудитель V.abortus представлен всеми 7 видами биоваров. Кроме этого среди образцов возбудителя бруцеллеза выделенных от крупного рогатого скота, были выявлены V.melitensis в 16 (5,6%) изолятах. При этом, обнаружены биовары 1,2,3.

Определение видов и биотипов бруцелл на конкретных территориях и очагах бруцеллезной инфекции имеет важное значение с точки зрения классификации очагов, определение степени напряженности эпизоотического процесса и выбор тактики профилактики.

Биологическая характеристика и изучение белкового состава клеточной мембраны бруцелл. С целью установления степени сходства и

различия видов и штаммов бруцелл, нами были проведены исследования полипептидного состава белков клеточной мембраны этих микроорганизмов.

Результаты анализа электрофореграмм внеклеточных белков различных видов бруцелл показали, что основное количество полипептидов лизата клеток бруцелл распределялось в пределах молекулярных масс от 12,3 до 80 кДа. Различия состояли в наличии у вида *V.abortus* минорной высокомолекулярной фракции (в районе 40 - 60 кДа.) по сравнению с другими видами бруцелл. Полипептид с молекулярной массой 37 - 40 кДа., выявляемый у вакцинных штаммов *V.abortus* и *V.melitensis*, отсутствовал на электрофореграммах других видов бруцелл.

В общей сумме все крупные фракции бруцелл образовывали 3 группы полипептидных полос в зоне относительной подвижности 59 - 66, 75 - 85 и 91 - 96 кДа. Кроме того, два штамма (*V.melitensis* 2506) имели по одной дополнительной полосе с 40 - 43 кДа. Установлено, что каждый вид бруцелл обладал определенным набором характерных фракций. Так, у штаммов вида *V.abortus* установлены три идентичные полипептидные фракции 65, 84, 93 кДа., а у штамма *V.abortus* 54 - дополнительная, свойственная только ему фракция 86 - 87 кДа. У штаммов *V.melitensis* выявлена одна крупная фракция с небольшой молекулярной массой 79.

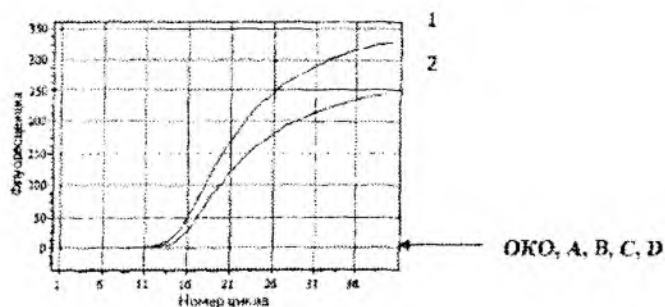


Рисунок 2 - Real-time PCR, флуоресценции культур бруцелл в зависимости от номера цикла. Ct (Cp) канала Rox (вид *V. melitensis*) ПЦР-РВ - 2. Обозначения: 1. *V.melitensis* 16 М (контроль); 2 - *V.melitensis* REV-1; ОКО - *Y. enterocolitica*, шт. Шойбулакский; А - *V.abortus* 19; В - *V.abortus* УФ-1; С - *V.abortus* 82; D - *V.abortus* 544.

Из рисунка 2 видно, что использованные штаммы бруцелл имеют существенные отличия по характеру флуоресценции в зависимости от цикла амплификации и каждому виду бруцелл свойственна своя специфика флуоресценции.

Установлено, что белковый спектр экзопродуктов бруцелл имел строго индивидуальный характер. Вместе с тем можно выделить и общие для видов признаки по наличию крупных фракций. На наш взгляд электрофоретические

характеристики экзобелков бруцелл могут быть использованы при штаммовой дифференциации этих бактерий.

Изучение степени гомологии нуклеотидных последовательностей ДНК различных штаммов бруцелл. Проведены молекулярно-генетические исследования 30 культур бруцелл. Вирулентных и вакцинных из них оказалось 26 эпизоотических штаммов. Для идентификации штаммов различного происхождения (вакцинных, эпизоотических) использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени - ПЦР-РВ с праймерами P1, P2, P3, P4, P5 и P6. Реакцию проводили в трех вариантах: ПЦР 1, мультиплекс ПЦР 2 и ПЦР 3.

Таким образом, в первой серии опытов по идентификации различных видов штаммов бруцелл с использованием 6 различных праймеров установлено, что все они имели идентичную для рода *Brucella* ДНК, которая выявлена у всех бруцелл при использовании праймера P1 (bsp31) в варианте ПЦР 1.

В параллельных молекулярно-генетических исследованиях указанных культур в вариантах ПЦР «Мультиплекс ПЦР2» и «ПЦР3» получены менее достоверные результаты. Так, при использовании праймера P2 (IS 711 a1kВ) положительная ПЦР-РВ была для бруцелл вида *V.abortus* 19, при использовании праймера P3 (IS 711 BME1 1162) - *V.melitensis* 16М.

В итоге из испытанных 6 видов праймеров оптимальным оказался праймер P1 (bsp31), который позволял идентифицировать род бруцелл независимо от вирулентности и степени диссоциации культур (S-, SR-, R-формы). Кроме того, праймеры P1 и P2 позволяли идентифицировать бруцеллы вида *V.abortus*, P1 и P3 - *V.melitensis*, P1 и P6 - *V. ovis*.

Определение биоваров в *V.abortus* и *V.melitensis* с помощью ПЦР-ПДФ. С применением метода рестрикционного анализа нами определены биовары в каждом типе бруцелл - абортус и мелитенсис. Результаты исследования 2х видов бруцелл *V.abortus*, *V.melitensis* показали, что названные виды бруцелл проявили положительную реакцию с использованными праймерами. Так, *V.abortus* вступала в реакцию ПЦР с праймерами P1(bsp31), P2(IS71 labk B), *V.melitensis* - P1 и P3 (IS711 BME1 1162).

Положительная реакция проб ДНК с праймером P1(bsp31), свидетельствует о принадлежности к роду *Brucella*, а дополнительное использование пар праймеров: P1 и P2; P1 и P3; P1 и P4; P1 и P6, а также P1 и P4 (или P1 и P5; P1 и P6) дает дополнительную информацию о видовой принадлежности бруцелл (*V.abortus*, *V.melitensis*).

Таким образом, в первой серии исследований по идентификации 2х различных видов штаммов бруцелл с использованием 6ти видов праймеров установлено, что оптимальным оказался праймер P1(bsp31), который позволял выявлять в исследуемых пробах ДНК, идентичную для рода *Brucella*; определять виды бруцелл независимо от вирулентности и степени диссоциации культур (S-, SR-, R-формы). Кроме того, праймеры P1 и P2

позволяли идентифицировать бруцеллы вида *B. abortus*, P1 и P2 - *B. melitensis*.

Положительные результаты первой серии опытов по генотипической идентификации выделенных (референтных, вирулентных и вакцинных) штаммов бруцелл послужили основанием для продолжения опытов по ПЦР-идентификации эпизоотических штаммов-изолятов бруцелл.

Молекулярный подход типирования был предложен учеными на основе рестриктазы полиморфизма в генах, кодирующих основные 25 - и 36-кДа наружных белков мембран бруцеллы (Cloeckaert *et al.*, 1995).

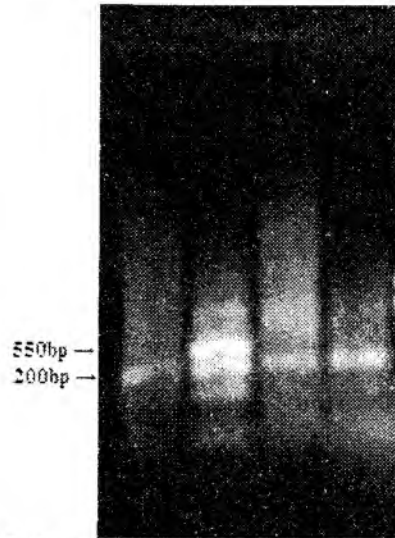


Рисунок 2 - PstI рестрикция расщепления продуктов ПЦР из 1100 bp области гена *omp2a*. Полоса 1; *B. melitensis* биотипа 1 (200 bp), стандартный штамм, предоставленный Кырг.НИИВ, Кыргызстан. Полоса 2; *B. abortus* (550 bp). Полосы 3; и 4: *B. melitensis* биотипа 1. Полосы 2, 3 и 4 из наших клинических образцов.

В нашем исследовании для идентификации *Brucella* spp. регистрируемой в ряде регионов, применили PCR-RFLP. При этом использовали генетический полиморфизм *omp2a* и *omp2b*. Этот локус был также использован для дифференциации видов и штаммов *Brucella*. Установлено, что использование полиморфизма в конкретном локусе является мощным инструментом для генотипирования бруцеллы. В нашей работе 1100 bp части *omp2a* были исследованы и продукты ПЦР были получены с использованием PstI рестриктазы.

В процессе исследований удалось установить различие между видами бруцелл и биотипов. Было обнаружено два типа бруцелл *B. melitensis* биовар 3 и *B. abortus* биовар 2. В регионах, где нет надлежащего контроля за

перемещением овец и крупного рогатого скота, проникновение новых видов, биоваров бруцелл реально возможно. Так, согласно наших исследований в республике регистрировался *B. melitensis* биовар 3.

Исследованиями установлено, что *B. abortus* биовар 2 также присутствует в эндемичных регионах республики. Знание типов бруцелл, и их биоваров регистрируемых в конкретной зоне, является важным условием в организации целенаправленных мер профилактики и лечения болезни.

Обнаружение бруцелл по методу АМОС ПЦР. В программу исследований входило освоение метода АМОС ПЦР для идентификации бруцелл до видовой принадлежности. Для этого взяты образцы крови от 330 коров и 310 овец из неблагополучных хозяйств разных регионов Кыргызской Республики с неизвестной историей вакцинации или инфекции. При исследовании из 330 проб от коров положительными оказались 4, из 310 проб от овец положительных - 5 проб. В результате амплификации контрольных образцов обнаружены в агарозном геле 498 пар нуклеотидов *B. abortus* и 731 пар нуклеотидов *B. melitensis*.

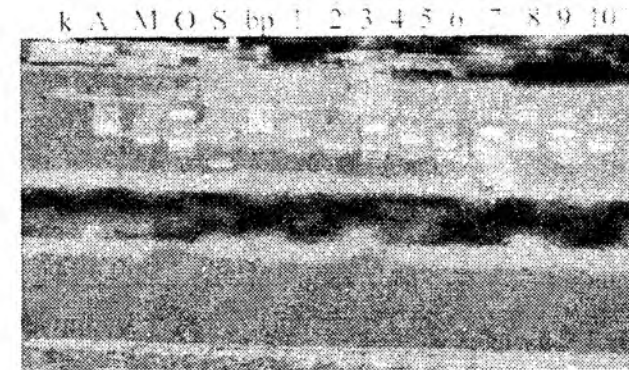


Рисунок 3 - Выделенные изоляты бруцелл из образцов крови коров; k – отрицательный контроль, А- положительный контроль для *abortus* (498 bp), М- положительный контроль для *melitensis* (731 bp), О- положительный контроль для *ovis* (976 bp), S- положительный контроль для *Suis* (285 bp). 1 проба-нет свечения, 2 проба- нет свечения. . 3 проба-498 пар нуклеотидов, 4-5- нет свечения, 7 проба 498 пар нуклеотидов, 8 проба нет свечения, 9 проба положительный контроль, 10 проба нет свечения.

На рисунка 3 видно, что на всех дорожках с ДНК – пробами обнаружили специфические светящиеся полосы (на уровне 498 п.н.), соответствующие контрольному фрагменту ДНК *Br. abortus*, а также светящиеся полосы (на уровне 731 п.н.), соответствующие контрольному фрагменту ДНК *Br. melitensis*.

Таким образом, с применением ПЦР-анализа удалось установить, что 2 образца из 4-х, выделенных из крови серопозитивных коров, принадлежат к *B.abortus*, а 2 образца из 5-ти, выделенных из крови серопозитивных овец, принадлежат к *B. melitensis* одна проба принадлежит к виду *B.ovis*.

Эти результаты были подтверждены с помощью полимеразной цепной реакции полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) с использованием молекулярных маркеров.

ВЫВОДЫ

1. В результате массовой вакцинации ярок с 2008г. вакциной Рев1 конъюнктивальным методом отмечено снижение зараженности МРС с 9,1% до 6,5% в 2013г. и КРС с 1,6% до 0,39%.

2. Изучено распространение типов бруцелл и их биоваров по регионам республики, так среди МРС вида *B.melitensis* зарегистрировано все 4 биовары, преобладали биовары 1-2-3 во всех регионах республики. Среди вида *B.abortus* встречались 1-2-3-6, преимущественно преобладали биовары 3-6. Среди КРС зарегистрировано вид *B.melitensis* биовар 1-2-3. среди вида *B.abortus* выявлены все 7 биоваров, из них преобладали 1-2-3-6. Установлена миграция *B.melitensis* среди КРС и *B.abortus* среди МРС.

3. Изучен полипептидный состав экзобелков, так у штаммов вида *B.abortus* обнаружены три идентичные полипептидные фракции молекулярной массой 65, 84, 93, а у штамма *B.abortus* 54 - дополнительная, *свойственная только ему фракция молекулярной массой 86 - 87. У штамма B.melitensis* 2506 выявлена одна крупная фракция с невысокой молекулярной массой с 79.

4. С применением ПЦР-ПДРФ и АМОС ПЦР удалось установить, что 2 пробы из 4-х, выделенных из крови серопозитивных коров, принадлежат к *B.abortus*, а 2 пробы из 5-ти, выделенных из крови серопозитивных овец, принадлежат к *B. melitensis*, одна проба принадлежит к виду *B.ovis*. Бруцелла типа *B.suis* не регистрировалась в исследованных образцах и отнесена как редко встречаемая.

VI. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Предложен для применения в профильных НИИ и ветеринарных лабораториях метод идентификации бруцелл в реакции ДНК-гибридизации с использованием адаптированного ПЦР анализа.

Разработаны и предложены для использования в практической работе биологических и ветеринарных лабораторий.

- методические рекомендации «Меры борьбы с бруцеллезом животных»;
- методические рекомендации "Обнаружение бруцелл в различном

биологическом материале с помощью полимеразной цепной реакции";

- модуль по стратегии борьбы с бруцеллезом для фермеров, частной ветеринарной, госслужбы, а также школьников.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Чегиров, С.Б. Идентификация бруцелл до вида при помощи классической ПЦР [Текст] / Р.З. Нургазиев, С.Б. Чегиров. З.С. Келдибекова, М.С. Турсумбетов // Вестник сельскохозяйственной науки. – 2010. №2. С.80-84.
2. Чегиров, С.Б. Эффективность конъюнктивального метода иммунизации овец против бруцеллеза вакциной из штамма Рев-1 [Текст] / М.С. Абаев, С.Б. Чегиров, М.С. Турсумбетов, М.И. Өмүрзакова // Вестник сельскохозяйственной науки. - 2012. №7. С.137-140.
3. Чегиров, С.Б. Бруцеллез яков в Кыргызской Республике [Текст] / М.С. Турсумбетов, С.Б. Чегиров, М.С. Абаев // Вестник сельскохозяйственной науки. - 2010. №3. С.81-83.
4. Чегиров, С.Б. Поствакцинальная диагностика бруцеллеза мелкого рогатого скота при различных схемах специфической профилактики [Текст] / М.С. Абаев, С.Б. Чегиров, М.С. Турсумбетов // Вестник сельскохозяйственной науки. – 2011. №5. С.163-166.
5. Чегиров, С.Б. Эпидемиологическая и эпизоотическая ситуация по бруцеллезу и его диагностика [Текст] / С.Б. Чегиров // Вестник сельскохозяйственной науки. – 2012. №6. С.295-298.
6. Чегиров, С.Б. Молекулярно-генетическое типирование бруцелл, циркулирующих в фермерских хозяйствах Ак-Талинского района Нарынской области [Текст] / Чегиров С.Б.// Наука и новые технологии. – 2013. №5. С. 130-133.
7. Чегиров, С.Б. Эпизоотическое, эпидемиологическое состояние Кыргызстана по бруцеллезу и принимаемые меры борьбы с ним/ С.Б. Чегиров, Р.З. Нургазиев [Текст] // Вестник КНАУ им.К.И.Скрябина. – 2014. №1 (30). С.80-83.
8. Чегиров, С.Б. Детекция бактерии рода бруцелла с помощью ПЦР-ПДРФ анализа [Текст] / С.Б. Чегиров // Вестник КНАУ им.К.И.Скрябина. – 2014. №1 (30). С. 84-87.
9. Чегиров, С.Б. Эпизоотическое, эпидемиологическое состояние Кыргызстана по бруцеллезу и принимаемые меры борьбы с ним [Текст] / С.Б. Чегиров // Вестник КазНИВИ. - 2014. №9. С.79-81.
10. Чегиров, С.Б. Определение бруцелл, циркулирующих среди сельскохозяйственных животных Ак-Талинского района, до видовой принадлежности [Текст] / С.Б. Чегиров // Вестник КазНИВИ. - 2014. №9. С.82-84.

11. Чегиров, С.Б. Молекулярно-биологическое типирование бактерии рода бруцелла с применением ПЦР анализ [Текст] / С.Б. Чегиров // Наука и новые технологии. – 2014. №2. С.120-123.

12. Чегиров, С.Б. Биологическая характеристика и изучение белкового состава клеточной мембраны бруцелл в Кыргызской Республике [Текст] / Чегиров С.Б. // Наука и новые технологии. – 2014. №2. С.113-116.

13. Чегиров, С.Б. Типизация *Brucella melitensis* и *abortus* до видовой принадлежности с применением видоспецифических праймеров [Текст] / С.Б. Чегиров, Р.З. Нургазиев, З.С. Келдибекова, М.С. Турсумбетов // Известия Вузов. – 2014. №3.С. 80-81.

КОРТУНДУСУ

Чегиров Саламат Биримкуловичтин

«Молекулярдык-биологиялык денгээлде Кыргызстандагы бруцелла мелитензиске жана бруцелла абортуска характеристика берүү» темасындагы биология илимдеринин кандидаты даражасын коргоочу диссертациясынын 06.02.02- ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология менен бирге микотоксикология жана иммунология адистиги боюнча.

Негизги сөздөр: бруцеллез, вакцина, штамм

Изилдөөнүн объектиси: ылаңдаган малдар, патологиялык материал, канднын сары суусу.

Иштин максаты: кыргызстандын ар кайсыл аймагынан бөлүнүп алынган бруцеллалардын молекулярдык биологиялык өзгөчөлүгүн изилдөө, бруцелланын тибин аныктоо үчүн жаңы иштелип чыккан ыкмаларды колдонуу менен ыкчамдалган ыкмаларды өздөштүрүү.

Изилдөөнүн ыкмалары: эпизоотологиялык көзөмөл, серологиялык, бактериологиялык жана молекулярдык-биологиялык.

Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы: Молекулярдык генетикалык ыкмаларды колдонуу менен эпизоотиялык көзөмөл жүргүзүлүүдө анын жыйынтыгында республиканын ар кайсыл аймактарында ылаңдаган малдардын даражасы тибине жараша бөлүндү.

Рев I вакцинасын колдонуунун натыйжасында бруцеллез ылаңынын төмөндөгөнү аныкталды.

B.melitensis ийри мүйздүү малдардын ылаңдаары аныкталды. ал эми *B.abortus* кой-эчкилер арасында катталып миграция аныкталды.

ПЦР анализинин жардамы менен бруцелланы түр өзгөчөлүгүнө чейин бөлүп аныктоо системасы сунушталды.

Ак-Талаа районунун айыл аймактарында бөлүнүп алынган бруцелланын тибин аныкталды.

Pst I ферментинин жардамы менен ДНКнын өлчөмү 850 түгөй нуклеотидден турган авируленттүү штамды 550-10000 чейин түгөй нуклеотидден турган вируленттик штамдан айырмалап аныктоого боло тургандыгы аныкталды.

ПААГ менен диск-электрофорезде бруцелла бактериясынын түр өзгөчөлүгү аныкталып бөлүнүп алынган бруцелла штамдарына генетикалык мүнөздөмө берилди.

Колдонуу чөйрөсү: эпизоотология, бактериология, молекулярдык биология, ветеринардык практика.

РЕЗЮМЕ

диссертация Чегирова Саламата Биримкуловича на тему «Молекулярно-биологическая характеристика бруцеллы мелитензис и бруцеллы абортус в Кыргызстане» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02- ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Ключевые слова: бруцеллез, вакцина, штамм

Объект исследования: восприимчивые животные, патологический материал, сыворотка крови животных.

Цель работы: изучение молекулярно-биологических свойств бруцелл, выделенных в разных регионах Кыргызской Республики, совершенствование экспресс-методов идентификации бруцелл с применением современных технологий и методик.

Методы исследования: эпизоотический мониторинг, серологический, бактериологический, молекулярно-биологический.

Полученные результаты их новизна: Установлен уровень зараженности с.х. животных по регионам республики.

Отмечена сокращения инфицированности с.х. животных бруцеллезом в результате массовой вакцинации ярок вакциной Рев I.

Установлена миграция возбудителя *B.melitensis* среди КРС и *B.abortus* среди овец.

Предложена и апробирована система видовой дифференциации бруцелл с помощью ПЦР анализа.

Проведена типизация бактерий рода бруцелл на территории Ак-Талинского района.

Установлено что применение рестриктазы Pst I позволяет проводить дифференциацию авирулентных штаммов бруцелл на основе наличия фрагментов размером 850 п.н. и вирулентных-на основе наличия фрагментов ДНК размером от 550 до 10000 п.н.

Дана генетическая характеристика выделенных штаммов бруцелл; с применением диск-электрофореза в ПААГ проведена идентификация и дифференциация видов и штаммов бруцелл.

Область применения: эпизоотология, бактериология, молекулярная биология, ветеринарная практика.