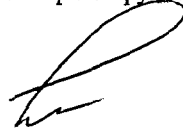


На правах рукописи



Шурахова Юлия Николаевна



003469921

Биологические особенности популяции и  
совершенствование методов индикации  
*Ornithobacterium rhinotracheale* в объектах  
птицеводства

16.00.06 — ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и  
ветеринарно-санитарная экспертиза

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

14 МАЯ 2009

Москва – 2009

Работа выполнена в Государственном научном учреждении  
Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной  
санитарии, гигиены и экологии Российской академии  
сельскохозяйственных наук ( ГНУ ВНИИВСГЭ Россельхозакадемии)

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук,  
доцент

Кононенко Анна Борисовна  
( ГНУ ВНИИВСГЭ)

**Официальные оппоненты:**

- доктор биологических наук,  
профессор

Светличкин Вячеслав Владимирович  
( ГНУ ВНИИВСГЭ)

- доктор ветеринарных наук,  
профессор

Белоусов Василий Иванович  
( ФГУ ЦНМВЛ)

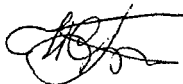
**Ведущая организация:** Московский государственный университет  
прикладной биотехнологии ( МГУПБ)

Защита состоится 03 июня 2009г. в 10<sup>00</sup> часов на заседании  
диссертационного совета Д 006.008.01 при ГНУ Всероссийский  
научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии,  
гигиены и экологии  
(123022,г.Москва,Звенигородское шоссе,5)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ  
Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной  
санитарии, гигиены и экологии.

Автореферат разослан 09 апреля 2009г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Павлова Н.С.

## 1. Общая характеристика работы

**Актуальность темы.** Орнитобактериоз – бактериальное, высококонтагиозное заболевание птиц, широко распространенное в странах с промышленно развитым птицеводством. Возбудитель орнитобактериоза - *Ornithobacterium rhinotracheale* циркулирует не только в птицеводческих предприятиях различных стран мира, но и среди диких птиц.

Первые упоминания об орнитобактерии датируются 1981 годом, когда *Ornithobacterium rhinotracheale* была впервые выделена в Германии от 5-недельных индюшат с признаками поражения органов дыхания, но способность *Ornithobacterium rhinotracheale* вызывать инфекцию подтверждена только в начале 90-х годов. В настоящее время заболевание, вызываемое *Ornithobacterium rhinotracheale*, зарегистрировано в Южной Африке, Германии, Нидерландах, Франции, США, Израиле, Англии, Бельгии и других странах (Joubert et al., 1999; Van Empel P. et al., 1999; и др.).

Особенности, характеризующие болезнь, вызываемую орнитобактериями, включают относительно слабые респираторные симптомы у молодых птиц, которые начинаются с чихания и исчезают через 1-2 недели. У погибшей птицы наиболее часто регистрируют аэросаккулиты, одно - или двухсторонние пневмонии, пенные скопления жидкости в грудной полости, анемичность, перикардиты и перитониты.

Заболевание, вызываемое орнитобактериями, может приносить значительный экономический ущерб за счет увеличения процента смертности, снижения яйценоскости, снижения вывода птенцов, повышения процента выбраковки и низкого показателя прироста.

Диагностика инфекций, вызванных *Ornithobacterium rhinotracheale*, затруднена, так как клинические симптомы и

посмертные изменения не специфичны и вызывают трудности дифференциации от других инфекций. Трудность заключается в том, что *Ornithobacterium rhinotracheale* может быть изолирована из биологического материала путем бактериологического анализа только на ранней стадии заболевания. Выделение *Ornithobacterium rhinotracheale* из патологического материала в соответствии с классическими процедурами бактериологического анализа занимает длительное время и достаточно трудоемко, так как колонии медленно растущей *Ornithobacterium rhinotracheale* очень мелкие и их рост не всегда заметен при более быстром росте других видов бактерий.

Наиболее перспективными в плане индикации *Ornithobacterium rhinotracheale* являются методы, основанные на обнаружении их генетического материала в пробе.

Целенаправленных исследований в данном направлении отечественные исследователи не проводили, отсутствуют сведения о распространенности *Ornithobacterium rhinotracheale* в Российской Федерации. В связи с изложенным, актуальным является усовершенствование методов индикации и идентификации *Ornithobacterium rhinotracheale* при проведении лабораторных исследований, изучение распространения *Ornithobacterium rhinotracheale* в птицеводческих хозяйствах Российской Федерации, изучение биологических особенностей популяций *Ornithobacterium rhinotracheale*.

**Цель и задачи исследования.** Изучить биологические особенности и усовершенствовать методы индикации и идентификации *Ornithobacterium rhinotracheale* при проведении лабораторных исследований биологических материалов от птиц и с объектов птицеводства.

Для достижения поставленной цели нами определены следующие задачи:

- изучить распространение *Ornithobacterium rhinotracheale* в птицеводческих хозяйствах РФ;
- изучить культуральные и биохимические свойства *Ornithobacterium rhinotracheale*;
- определить особенности морфологического строения популяции *Ornithobacterium rhinotracheale*;
- подобрать дифференциально–диагностические среды и условия культивирования *Ornithobacterium rhinotracheale*;
- подобрать праймеры и оптимизировать параметры постановки ПЦР в целях совершенствования индикации *Ornithobacterium rhinotracheale*;
- провести серологический мониторинг среди птицеводческих хозяйств на наличие антител к *Ornithobacterium rhinotracheale*;
- разработать методические рекомендации по индикации *Ornithobacterium rhinotracheale* в объектах птицеводческих хозяйств.

#### **Научная повизна**

Впервые определена распространенность *Ornithobacterium rhinotracheale* (ОРТ) в птицеводческих хозяйствах на территории Ф.

Изучены культуральные и биохимические свойства *Ornithobacterium rhinotracheale*, определены оптимальные условия культивирования на питательных средах.

Впервые изучены морфологические особенности роста и азвития популяций *Ornithobacterium rhinotracheale*, а также выявлен гетероморфизм с проявлением L–трансформации с омощью метода сканирующей электронной микроскопии.

Установлена патогенность *Ornithobacterium rhinotracheale* для птиц путем воспроизведения экспериментальной инфекции.

Подобрана специфическая пара праймеров и оптимизированы параметры процесса амплификации для постановки ПЦР (полимеразной цепной реакции).

Определена эффективность использования методов генетической диагностики (ПЦР) при обнаружении ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale*, позволяющих установить наличие возбудителя орнитобактериоза при его содержании в пробе 100 микробных клеток (м.к.) и значительно сократить срок проведения исследования.

#### **Практическая ценность работы**

Разработаны и предложены ветеринарной практике «Методические рекомендации по индикации *Ornithobacterium rhinotracheale* методом полимеразной цепной реакции» (утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 27.03.2009г), которые находятся на апробации для внедрения в учебный процесс курсов дополнительного образования для ветеринарных специалистов ветлабораторий РФ на базе ФГУ ЦНМВЛ.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

- заседаниях учёного совета ГНУ ВНИИВСГЭ (2007, 2008 гг);
- Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика», Москва (2007);
- расширенном совещании сотрудников лаборатории ГНУ ВНИИВСГЭ (2009г.)

**Публикации.** Материалы диссертации отражены в четырех научных статьях, в том числе одна в журнале, рекомендованном ВАК РФ («Ветеринарная патология»).

**Объём и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, собственных исследований, обсуждения, выводов и практических предложений. Библиографический список включает 125 публикаций, из них 70 зарубежные источники. Материалы иллюстрированы 3 сканограммами, 2 фотографиями, 9 рисунками и 4 таблицами.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- Результаты комплексного изучения биологических свойств *O. rhinotracheale*.
- Широта распространения *O. rhinotracheale* в птицеводческих хозяйствах РФ на основании серологических исследований.
- Результаты подбора специфических праймеров для молекулярно-генетической диагностики орнитобактериоза.
- Экспериментальные данные по разработке метода обнаружения ДНК *O. rhinotracheale* с помощью ПЦР.

## **2. Собственные исследования**

### **Материалы**

Работа выполнена в период с 2005 по 2008 гг. в лаборатории санитарной микробиологии ГНУ ВНИИВСГЭ и на базе ФГУ ЦНМВЛ (отдел болезней птиц, иммуноферментной и молекулярной диагностики).

В работе использовано 2 референтных штамма *Ornithobacterium rhinotracheale* (К-33, К-282) из коллекции бактериальных культур ветеринарной лаборатории LOHMAN TIERZUCHT (Германия) и культуры *E.coli*, *P.multocida* (ФГУ ЦНМВЛ).

Пробы патологического материала для бактериологических исследований в целях выделения *Ornithobacterium rhinotracheale* и сыворотки крови для обнаружения антител к возбудителю орнитобактериоза методом иммуноферментного анализа отбирали от птиц из разных птицеводческих хозяйств РФ.

Для выполнения поставленных задач нами проведено 285 бактериологических исследований и исследовано серологическим методом 229 сывороток крови.

При выполнении работы использовали следующие питательные среды: питательный бульон сухой для культивирования микроорганизмов (ННПЦ ГИП, г. Оболенск), питательный бульон на переваре Хоттингера с содержанием 20 мг/% аминного азота, мясо-пептонный бульон, бульон с сердечно-мозговым настоем, питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ — агар) (ННПЦ ГИП, г. Оболенск), шоколадный агар, агар с сердечно – мозговым настоем и среда Эндо.

Для определения биохимических свойств *Ornithobacterium rhinotracheale* нами были использованы стрипы фирмы BioMerieux API – 20 Ne и API ZYM.

### Методы

Бактериологические исследования трупов птиц проводили классическими методами, используемыми в бактериологии.

Подбор видоспецифических праймеров к геному *O. rhinotracheale* осуществляли на основе информации международного банка генетической информации GenBank с использованием предложенных программ расчёта.

Праймеры, синтезированные и очищенные посредством электрофореза в полиамидном агарозном геле, были получены от фирмы “Синтол” и ЗАО «Литех» (Россия).



Чувствительность ПЦР с выбранными праймерами определяли в опытах с ДНК чистых культур штаммов *O. rhinotracheale* с концентрацией взвеси культуры  $1 \times 10^9$  м.к./ мл, приготовленной в соответствии со стандартными методами, лимитирующими разведения.

Проверку родоспецифичности системы для обнаружения *O. rhinotracheale* осуществляли с ДНК штаммов *O. rhinotracheale* и ДНК бактерий *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*.

Выделение и очистку ДНК из суспензий культуры *O. rhinotracheale* и патологического материала проводили тремя методами:

1) с помощью набора «ДНК-сорб-А-50» ФГУН ЦНИИЭ по предложенной производителем методике. Процедура выделения включала стадии лизиса, сорбции и отмывания.

2) с использованием ионного детергента СТАВ (цилтриметиламмоний бромид), образующего нерастворимый комплекс с нуклеиновыми кислотами, и очистки ДНК с помощью магнитосорбции с «Silica».

3) при помощи платформы NucliSENS® easyMAG™ — системы второго поколения компании bioMérieux для автоматического выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов, основанной на технологии экстракции с использованием магнитных частиц.

Аmplификацию ДНК *O. rhinotracheale* проводили с использованием набора «АмплиСенс-200-1» (ФГУН ЦНИИЭ), согласно инструкции по применению набора.

Реакционная смесь из расчёта на 1 пробирку (объем 25 мкл) содержала:

«нижняя» ПЦР – смесь:

- По 1 мкл каждого праймера;
- 2 мкл нуклеотидов (dNTP – mix), т.е. «нижняя» смесь содержала праймеры и нуклеотиды в равных частях.

«верхняя» ПЦР – смесь:

- 50  $\mu$ M MgSO<sub>4</sub> – 1,5 мкл;
- Таг-полимераза – 0,5 мкл;
- Денионизованная вода – 3 мкл.

Аmplификацию проводили на многоканальном амплификаторе «I-CYCLER» (BIORAD) по следующей программе:

Цикл	Температура	Время	Количество циклов
1	95°C	3 мин	1
2	95°C	40 сек	40
	55°C	40 сек	
	72°C	40 сек	
3	72°C	4 мин	1

Продукты амплификации выявляли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий, с дальнейшей визуализацией геля при подсвечивании ультрафиолетовым излучением.

Исследования по обнаружению антител к возбудителю орнитобактериоза проводили с помощью непрямого варианта ИФА (ELISA – твердофазный иммуноферментный анализ).

Обнаружение антител проводили с использованием набора FLOCKCHECK<sup>®</sup> ORT (*Ornithobacterium rhinotracheale* Antibody Test Kit), IDEXX.

Учёт результатов ИФА проводили на спектрометре (ридере) «Униплан» с вертикальным лучом света при длине волны 620 нм.

### 3. Результаты исследований

#### Оценка морфологических, культуральных и биохимических свойств *Ornithobacterium rhinotracheale*

На первом этапе исследований проведено изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств *Ornithobacterium rhinotracheale* при росте на различных питательных средах.

Культуру каждого штамма *O. rhinotracheale* в равной посевной дозе засекали параллельно в две пробирки с жидкими питательными средами. Одну часть пробирок инкубировали в условиях обычного термостата, а вторую в условиях  $\text{CO}_2$ - инкубатора с содержанием 7,5% углекислого газа. Посевы инкубировали при 37°C в течение 48 часов.

Видимый рост *O. rhinotracheale* в жидких питательных средах не наблюдался.

Посев на плотные питательные среды проводили бактериологической петлёй. Культуру каждого штамма *O. rhinotracheale* засекали параллельно на две чашки Петри. Одну часть чашек инкубировали в условиях обычного термостата, а вторую в условиях  $\text{CO}_2$ - инкубатора с содержанием углекислого газа 7,5%.

Рост культур учитывали через 24 и 48 ч инкубирования при 37°C в условиях термостата.

При испытании различных питательных сред установлено, что оптимальный рост орнитобактерий отмечен при инкубации на 5%-ом кровяном агаре (овечьем) в течение 48 часов при температуре 37°C в микроаэрофильных условиях (7,5%  $\text{CO}_2$ ). Через 24 часа инкубации *O. rhinotracheale* образует точечные колонии. Спустя 48 часов наблюдается рост орнитобактерий в виде мелких, округлых, выпуклых матовых колоний серого цвета. Слабый рост бактерий

отмечен также на следующих плотных питательных средах: шоколадном агаре, агаре с сердечно-мозговым настоем и полностью отсутствовал на среде Эндо и ГРМ-агаре.

При изучении морфологии орнитобактерий в мазках, окрашенных по Граму, установлено, что они имеют вид мелких грамотрицательных полиморфных палочек, иногда образующих нити или принимающих коккоподобную форму. При окраске по методу Ожешки спор не обнаружено. При микроскопии культур методом «висячей капли» установлена их неподвижность.

В опытах по идентификации *O. rhinotracheale* на первоначальном этапе после установления формы клетки и окраски по Граму у грамотрицательных полиморфных палочковидных бактерий определяли каталазную и оксидазную активность.

Затем изучали ферментативные и биохимические характеристики с использованием биохимических стрипов для дифференциации бактерий.

При определении биохимических свойств использовали 48-часовые бактериальные культуры, выращенные на кровяном агаре.

Нами определены наиболее важные показатели, учитываемые при идентификации орнитобактерий. Результаты представлены в таблице 1.

При изучении ферментативных свойств нами установлено, что *O. rhinotracheale* не редуцируют нитраты, не обладают каталазной и оксидазной активностью, уреазоотрицательны, положительны относительно В-галактозидазы и аргининдегидролазы, отрицательны относительно лизиндекарбоксилазы и орнитиндекарбоксилазы, ферментируют фруктозу, лактозу, мальтозу и галактозу.

Основные ферментативные свойства *O. rhinotracheale*

Наименование теста	Результат теста
Редукция нитритов	-
Каталаза	-
Оксидаза	-
Уреаза	-
В-галактозидаза	+
Аргининдегидролаза	+
Индол	-
Рост на Эндо агаре	-
Лизиндекарбоксилаза	-
Орнитиндекарбоксилаза	-
Ферментация сахаров:	
Фруктоза	+
Лактоза	+
Мальтоза	+
Галактоза	+

При изучении культуральных свойств установлено, что *O. rhinotracheale* не способны к росту на среде Эндо.

**Изучение популяции *Ornithobacterium rhinotracheale* методом сканирующей электронной микроскопии**

Изучению с помощью сканирующей электронной микроскопии были подвергнуты популяции *O. rhinotracheale*, полученные путём культивирования на кровяном агаре при 37°C.

Исследование колоний *O. rhinotracheale* в S-форме в сканирующем электронном микроскопе показало, что популяции представлены однородными, плотно упакованными палочковидными клетками размером 2,0-0,7 мкм, имеющими определенную ориентацию. Клетки бактерий более мелкие по сравнению с эшерихиями, сальмонеллами и другими грамотрицательными бактериями. Выявлено образование коротких цепочек,

обусловленных процессом незавершенного деления и разделения клеток, что является проявлением начального этапа гетероморфизма.

В участках колонии, где формировались покровы в виде тонкой пленки, просматривались полноценные бинарно делящиеся бактериальные клетки. Изучение периферийных участков колоний выявило наличие выраженного гетероморфизма.

Полученные нами данные о полиморфизме популяции свидетельствуют о гетерогенности культур *O. rhinotracheale*.

### Экспериментальное воспроизведение инфекции

Эксперименты по воспроизведению инфекции проводились на СПФ – цыплятах (СПФ (SPF) — свободный от патогенных факторов).

Цыплят заражали одновременно назально и per os суспензией культуры *O. rhinotracheale*, штамм К33.

Целью данного эксперимента была реизоляция исходной культуры *O. rhinotracheale* из органов зараженных цыплят после диагностического убоя или в случае падежа.

Наблюдение за опытной группой цыплят велось в течение 30 дней по следующим показателям: активность цыплят, клинические проявления орнитобактериоза, масса тела.

Установлено, что цыплята опытной группы заметно отставали в росте от контрольных, оперение происходило медленнее.

Через 30 дней после заражения цыплят подвергли диагностическому убою для бактериологического исследования и получения сыворотки крови с целью обнаружения антител к *O. rhinotracheale*.

При патологоанатомическом исследовании трупов цыплят у 3 особей из опытной группы была отмечена мелкоочаговая пневмония

верхушечных долей лёгких. Однако, при бактериологическом исследовании органов от вынужденно убитых цыплят выделить исходную культуру *O. rhinotracheale* не удалось.

При исследовании сывороток крови от вынужденно убитых цыплят методом ИФА в сыворотке крови цыплят опытной группы были обнаружены антитела к *O. rhinotracheale* в низком титре, а в сыворотке крови цыплят контрольной группы антитела отсутствовали.

Таким образом, нам удалось экспериментально воспроизвести инфекцию, которая характеризовалась отставанием в росте цыплят, развитием пневмонии, но без проявления клинических (респираторных) признаков инфекции. Вероятно, в условиях птицефабрики присутствие *O. rhinotracheale* в стаде негативно сказывается на иммунном статусе поголовья, в результате чего присоединяются другие патогены и инфекция, вызванная *O. rhinotracheale*, в смешанном течении протекает с более выраженными клиническими признаками.

### **Изучение распространенности орнитобактериоза**

Широта распространения орнитобактериоза на территории РФ определялась нами по результатам исследований методом ИФА сывороток крови птиц.

Исследования проводились в 8 птицеводческих хозяйствах различных регионов РФ. Число исследованных сывороток на наличие антител к *O. rhinotracheale* составило 229. Полученные результаты исследований представлены в таблице 2.

В результате серологического анализа сывороток крови птиц на наличие антител к *O. rhinotracheale* с помощью иммуноферментного анализа нами установлено, что специфические антитела обнару-

жены в 83% или 190 пробах сывороток из 229, исследованных на *O. rhinotracheale*, из них 13% (или 29 проб) составили сыворотки с высоким уровнем антител к *O. rhinotracheale* и 70% (161 проба) соответственно с низким уровнем.

Таблица 2

Результаты серологических исследований.

Вид птиц	Общее количество проб	Количество проб		
		с высоким уровнем антител	с низким уровнем антител	в которых антитела к ОРТ не обнаружены
куры	184	28	117	39
индейка	45	1	44	-

В опытах исследовали не менее 10 образцов сыворотки крови птиц из каждого птичника. Прямой зависимости между возрастом птицы и процентом выявления антител к *O. rhinotracheale* нами не установлено.

Частота встречаемости *O. rhinotracheale* среди исследованных птицеводческих хозяйств составила 100%. При этом в числе неблагополучных птицефабрик находятся как хозяйства яичного, так и мясного направления.

Как показывают наши исследования, распространение *O. rhinotracheale* имеет широкие масштабы среди поголовья птиц, принадлежащих к различным хозяйствам и регионам РФ. Этот факт говорит о возможности значительных экономических потерь российского птицеводства.



## Разработка метода обнаружения возбудителя орнитобактериоза на основе ПЦР

Создание праймеров для детекции возбудителя орнитобактериоза методом ПЦР включало в себя подбор специфических олигонуклеотидных праймеров, обладающих сродством к определенным участкам выделяемой нуклеотидной последовательности, на основе компьютерного анализа максимально возможного количества нуклеотидных последовательностей гена или фрагментов гена *O. rhinotracheale* для уменьшения вероятности ложноотрицательных результатов ПЦР-анализа. Из представленных в компьютерной базе данных GenBank была создана подбаза, содержащая все известные данные о нуклеотидных последовательностях генома и отдельных генов *O. rhinotracheale*. Анализ последовательностей и выбор праймеров проводили с помощью пакета программы «BioEdit Sequence Alignment Editor» и программы «OLIGO».

На основании компьютерного анализа, а также литературных данных были подобраны две пары праймеров:

1 пара - LP1 gga tag gca tgc gtc aga tt,

RP1 tca gag tcc cct cca ttg tc.

2 пара -OR16S-F1 (GAG AAT TAA TTT ACG GAT TAA G)

OR16S-R1 ( TTC GCT TGG TCT CCG AAG AT )

Оценка специфичности сконструированных праймеров при помощи программы BLAST подтвердила гомологичность выбранных праймеров и отсутствие значимой гомологичности с нуклеотидными последовательностями других видов бактерий.

Для подтверждения специфичности выбранных праймеров использовали ДНК штаммов культур *O. rhinotracheale*.

Обе пары выбранных праймеров позволили получить специфические фрагменты, но наиболее удачной оказалась вторая пара

праймеров (LP1 gga tag gca tgc gtc aga tt, RP1 tca gag tcc cct cca ttg tc), так как отмечалась более яркая полоса амплификации, отсутствовали шмеры.

### **Сравнительный анализ методов выделения ДНК из патологического материала от птиц**

С целью оптимизации пробоподготовки, а именно экстракции ДНК, для апробации на различном материале нами были выбраны три методики:

1. Обработка исследуемого материала с использованием набора для выделения ДНК ( ДНК- сорб, ФГУ ЦНИИЭ).
2. Использование ионного детергента СТАВ (цилтриметил-аммониум бромид) и очистка ДНК с помощью магнитосорбции с «Silica».
3. Экстракция нуклеиновых кислот с помощью системы NucliSENS easyMAG.

Параметрами оценки являлись уровень чувствительности и воспроизводимость результатов ПЦР с использованием того или иного способа экстракции ДНК, а также наличие или отсутствие фоновой амплификации, приводящей к появлению шмеров на электрофореграмме.

Наш анализ показал, что, исходя из выбранных критериев оценки, все три метода проявили одинаковую эффективность, однако платформа NucliSENS® easyMAG® для выделения нуклеиновых кислот упрощает процесс выделения ДНК и сокращает время проведения исследования. Высокопроизводительная автоматическая экстракция с минимумом ручных операций и очень коротким временем производственного цикла (24 экстракции за 40 минут)

весьма перспективна для проведения диагностических исследований в современных условиях.

### **Оптимизация процесса амплификации**

Экспериментально нами была установлена концентрация праймеров, составляющая 10 пмоль в 20 мкл реакционной смеси.

При оптимизации количества ДНК-пробы учитывался тот факт, что содержание её в реакционной смеси не должно превышать 1мкл. Применяемая нами методика подготовки проб позволяла вносить в реакционную ПЦР – смесь пробу ДНК, концентрация которой не превышала предел оптимума.

Для сокращения материальных затрат и времени проведения анализа нами были использованы коммерческие наборы для амплификации НПЦ Нарвак и Ампли Сенс ИЛС.

Протекание ПЦР регулируется изменением температуры рабочей смеси. Для поддержания работы системы на протяжении всей ПЦР нами был подобран режим этапа денатурации, составляющий 95°C – 40 сек. При этом учитывалось, что время, за которое Taq –полимераза при нагревании до 95°C теряет 50% своей эффективности, составляет 40 мин. В дополнение к этому для наиболее полного плавления ДНК перед началом циклической программы амплификации проводили пролонгированный этап денатурации при 95°C в течение 3 мин.

В большинстве случаев проведение амплификации специфических локусов без образования побочных ПЦР – продуктов осуществляют за счёт оптимально подобранных условий отжига. Корректировку температуры отжига сконструированных праймеров проводили экспериментально, исходя из предварительно произведенных расчетов по формулам. Наиболее эффективной температурой отжига оказалась температура 55°C.

Температурный режим элонгации, составивший 72°C в течение 40 сек, был подобран эмпирически с учётом, что оптимум активности Taq – ДНК – полимеразы достигается при 74°C, а скорость работы фермента может составить 60 нуклеотидов/мин. Кроме того, для наиболее полного синтеза ампликонов, образующихся в ходе последнего цикла ПЦР, был проведен заключительный пролонгированный этап синтеза в течение 4 мин.

Учитывая, что кинетика ПЦР имеет экспоненциальный характер на начальном этапе, после чего начинается выход на плато, нами была эмпирически подобрана продолжительность реакции в 40 циклов амплификации.

На следующем этапе работы для подтверждения теоретических расчётов нами была проведена экспериментальная оценка специфичности и гетерологичности сконструированных праймеров к ДНК *O. rhinotracheale*.

#### **Апробация чувствительности и специфичности сконструированной ПЦР тест – системы**

С целью определения чувствительности и специфичности ПЦР – системы нами использовались различные концентрации суспензии штаммов культуры *O. rhinotracheale*.

Изучение чувствительности ПЦР с выбранными праймерами проводили на препаратах ДНК, выделенных из бактериальных суспензий *O. rhinotracheale* с концентрацией  $1 \times 10^2$  –  $1 \times 10^5$  микробных клеток/мл. Чувствительность реакции составила 100 микробных клеток/мл.

Постановка ПЦР реакции с ДНК – матрицами, содержащими *O. rhinotracheale*, приводила к выявлению ампликона ожидаемого размера (164 нуклеотидных пар).

Специфичность выбранных праймеров проверили на материалах, содержащих гетерологичные бактерии – *E.coli*, *P.multocida*. Результаты, полученные в ходе исследований, показали, что амплификация с гетерологичными ДНК-матрицами всегда давала отрицательные результаты, что подтверждает специфичность выбранной пары праймеров .

### Выводы

1. Установлено, что оптимальной средой для культивирования *Ornithobacterium rhinotracheale* является 5%-й кровяной агар (овечий). Бактерия труднокультивируемая, медленно-растущая, представлена мелкими прозрачными колониями, рост которых часто подавляется посторонней микрофлорой.
2. Минимальный набор признаков для дифференциации *O.rhinotracheale* включает: мелкий размер колоний, отсутствие капсулы и жгутиков, каталаза «-», оксидаза «-», уреазы «-» , В-галактозидаза «+», аргининдегидролаза «+», индол «-», рост на среде Эндо «-», лизиндекарбоксилаза «-», орнитиндекарбоксилаза «-», ферментация сахаров: фруктоза «+», лактоза «+», мальтоза «+», галактоза «+».
3. Впервые изучены морфологические особенности роста и развития популяций *O. rhinotracheale* методом сканирующей электронной микроскопии. Популяция *O. rhinotracheale* представлена упорядоченными плотно упакованными, мелкими, слегка изогнутыми клетками палочковидной формы. Нередко образуются короткие цепочки из клеток, что обусловлено процессом их незавершенного деления и разделения. По периферии

колоний отмечается гетероморфизм с различными проявлениями L- трансформации.

4. Установлено широкое распространение *O. rhinotracheale* в птицеводческих хозяйствах РФ. Специфические антитела обнаружены в 83% сывороток крови птиц, исследованных на ОРТ, из них 13% - сыворотки с высоким уровнем и 70% - с низким уровнем антител к ОРТ.
5. На основе ПЦР разработан высокоспецифичный метод индикации орнитобактерий в патологическом материале, смывах с объектов окружающей среды, кормах. Чувствительность метода составляет 100 микробных клеток в пробе.
6. Экспериментально установлена способность орнитобактерий вызывать у цыплят заболевание в моноинфекции без ярко выраженных клинических признаков, при этом возбудитель обнаруживается в патологическом материале методом ДНК-диагностики.
7. Высокая чувствительность (обнаружение 100 микробных клеток) и специфичность в присутствии посторонней микрофлоры, значительное сокращение срока исследования позволяют применять разработанный метод на основе ПЦР для проведения скрининга на присутствие *O. rhinotracheale* в патологическом материале птиц и объектах окружающей среды.

## Практические предложения

Для практического применения предложены «Методические рекомендации по индикации *O. rhinotracheale* методом полимеразной цепной реакции», утвержденные Отделением ветеринарной медицины РАСХН 27.03.2009г. Рекомендации могут быть использованы в научно-исследовательских учреждениях при подготовке ветеринарных специалистов.

## Список опубликованных работ

1. Шурахова Ю.Н., Кононенко А.Б., Виткова О.Н. /Перспективы использования ПЦР-анализа при индикации *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* в объектах птицеводства и патологическом материале//, материалы Всероссийской научно-практической конференции Молекулярная диагностика, М.: 2007, стр.119-120.
2. Шурахова Ю.Н. /Обсуждение праймеров для постановки ПЦР для обнаружения ДНК возбудителя орнитобактериоза и определение биологических особенностей *Ornithobacterium rhinotracheale*//. Труды ВНИИВСГЭ, М.: 2008, том 119, стр.38-40.
3. Шурахова Ю.Н., Кононенко А.Б., Виткова О.Н. /*Ornithobacterium rhinotracheale*: распространение и диагностика// Сборник материалов птицеводческого конгресса, Москва, 2007, стр.181-183.
4. Шурахова Ю.Н. /Биологические особенности популяции *Ornithobacterium rhinotracheale* и перспективы ее обнаружения в объектах птицеводства// Ветеринарная патология, № 1, М.: 2008, стр.95-99.

---

ГНУ ВНИИВСГЭ, 2009, г. Москва, Звенигородское ш., 5, заказ 3/7/7, тираж 80 экз.