



На правах рукописи

ЖМУРОВ НИКОЛАЙ НИКОЛАЕВИЧ

**ИЗЫСКАНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССНЫХ
МЕТОДОВ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЕЗА**

16 00 03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук



КРАСНОДАР – 2008

Работа выполнена на кафедре микробиологии и патанатомии ФГОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет им К Д Глинки» и в Воронежской областной ветеринарной лаборатории

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
С.Г. Субботина

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук Наталья Юрьевна Басова
доктор ветеринарных наук, профессор Людмила Александровна Малышева

Ведущая организация:

ФГОУ ВПО «Курская государственная сельскохозяйственная академия им И И Иванова»

Защита диссертации состоится 8 мая 2008 года в 10⁰⁰ ч на заседании диссертационного совета Д 220 038 07 при ФГОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет»
по адресу: 350044 г. Краснодар, ул Калинина, 13

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет»

Автореферат разослан 4 апреля 2008 года

Ученый секретарь
диссертационного совета



И А Родин

1. Введение

1.1 Актуальность проблемы Сложность и нестабильность эпизоотической обстановки по туберкулезу практически во всех странах, значительное ухудшение эпидемиологической ситуации, утяжеление течения туберкулезного процесса, всевозрастающее в последние годы число сообщений об увеличении количества заболеваний микобактериозами обусловили концентрацию внимания исследователей на проблемах дифференциации туберкулеза от других микобактериозов и совершенствования методов выделения и идентификации микобактерий туберкулеза (А Л Лазовская, 1999, Т Ю Салина с соавт, 2000, В И Гольшевская с соавт, 2001, Е М Скрягина с соавт, 2001, Р А. Нуралинов с соавт, 2002)

Используемые в настоящее время традиционные микробиологические методы выявления и идентификации микобактерий (бактериоскопический и культуральный) по многим причинам не удовлетворяют практику

Современная лабораторная диагностика туберкулеза должна быть ориентирована на возможность нетривиального подхода к представлению о возбудителе этого заболевания и, следовательно, коррекциям рутинных лабораторных приемов. Диагностика же не должна основываться лишь на выявлении классических возбудителей, она должна предусматривать индикацию различных морфологически изменённых вариантов микобактерий, что особенно важно при изучении нативного биоматериала, в связи с чем все большее предпочтение отдается методам целенаправленного влияния и доказательства видовой принадлежности биологически изменённых, в том числе зернистых, ультрамелких и других форм микобактерий

Одним из таких методов является прямой метод микрокультивирования микобактерий в жидкой питательной среде на парафиновом носителе (С Г Субботина, 1991). Ценным преимуществом метода является возможность индикации, выделения и идентификации микобактерий в микрокультурах на парафиновых дисках, в весьма короткие сроки в сравнении с традиционными методами прямого посева на плотные яичные питательные среды

Экспрессное обнаружение и идентификация микобактерий этим методом обеспечивается классическим сочетанием культурального (микро – и макрокультивирования) и микроскопического методов исследования, которые остаются актуальными, несмотря на появление большого числа альтернативных методов.

1.2 Цель и задачи исследования. Повышение результативности, чувствительности и достоверности метода микро – и макрокультивирования микобактерий на твердом парафине в жидкой питательной среде для их экспрессной индикации, выделения, идентификации и динамического наблюдения за развитием в живых культурах, разработка новых приёмов и методов микро – и макрокультивирования микобактерий

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие задачи

– усовершенствовать способы обработки диагностических биоматериалов перед бактериологическим исследованием;

– изыскать и разработать более результативные и доступные питательные среды для микро – и макрокультивирования микобактерий,

– изучить диагностическую ценность для микро – и макрокультивирования разработанных нами новых и некоторых известных жидких и плотных питательных сред, содержащих и не содержащих парафины,

– модифицировать приемы микро – и макрокультивирования, регистрации морфологических особенностей и роста микобактерий,

– изучить эффективность некоторых методов идентификации микобактерий.

1.3. Научная новизна. Изучена эффективность очистки диагностических биоматериалов от посторонней микрофлоры несколькими способами

– предпосевной обработкой традиционными приемами, в сравнении, несколькими детергентами,

– воздействием некоторых детергентов, содержащихся в питательной среде, в течение всего периода микрокультивирования микобактерий на парафиновых дисках в жидкой питательной среде

Разработан модифицированный, рациональный способ обогащения микобактериями диагностических биоматериалов для бактериологического исследования на туберкулез Проведена сравнительная оценка информативности жидких питательных сред (баранья цитратная кровь, синтетическая минеральная среда, среда Сотона и 5 % МПГБ) для изоляции микобактерий методом микро – и макрокультивирования на парафиновых дисках из различных диагностических биоматериалов

Установлена эффективность модифицированного нами метода микро – и макрокультивирования микобактерий на парафиновых дисках в жидкой питательной среде для экспрессной индикации и выделения микобактерий из различных диагностических биоматериалов, для динамичного наблюдения за формированием и ростом микро – и макрокультур микобактерий и морфологической изменчивостью их бактериальных клеток в ранние сроки развития, в течение первой недели, для идентификации по морфологическим свойствам микро – и макрокультур микобактерий, окрашенных 0,2 % растворами анилиновых красок (нейтральрога, малахитовой зелени), вносимых в питательную среду к концу первой недели инкубирования

Установлена возможность индикации и дифференциации микобактерий традиционными морфо-культуральными бактериологическими методами в комплексе с усовершенствованными и разработанными нами новыми методами микро – и макрокультивирования в жидких и плотных питательных средах, содержащих парафины

Впервые установлены

– способ приготовления плотных питательных сред с жидким парафином – вазелиновым маслом для культивирования микобактерий, с целью ускоренной их индикации, выделения и обильного накопления биомассы,

– феномены поверхностного и ускоренного роста различных видов микобактерий на плотных питательных средах, содержащих вазелиновое масло, при первичном выделении микобактерий из диагностических биоматериалов и при посеве суспензий чистых культур патогенных и непатогенных микобактерий,

– способ продления срока сохранения влажности различных по составу плотных питательных сред, вне зависимости от способа внесения в них вазелинового масла,

– высокая результативность индикации и выделения микобактерий методом микро – и макрокультивирования на плотных, различных по составу и питательной ценности, питательных средах, содержащих 5 % жидкого парафина - вазелинового масла (Решение о выдаче патента на изобретение за № 2006139239/13(042785),

– эффективность индикации, выделения и накопления биомассы микобактерий путем последовательного проведения микро – и макрокультивирования микобактерий, вначале в жидкой питательной среде с твердым парафином, затем с последующим посевом на плотные (агаризованную и яичную) питательные среды, содержащие жидкий парафин,

– определена диагностическая ценность выявления и выращивания микобактерий на различных по составу и питательной ценности плотных питательных средах, содержащих вазелиновое масло, в сравнении с известным прямым посевом на стандартную среду Левенштейна – Йенсена (без вазелинового масла) и жидкую питательную среду накопления (5 % МПГБ с парафиновыми дисками),

– установлено, что видовая специфичность микобактерий не изменяется после длительного выращивания (до 30 суток, срок наблюдения) микобактерий на жидких и плотных питательных средах, содержащих в своем составе парафины

1.4. Практическая ценность. Высокая результативность и значительное сокращение сроков индикации, выделения, выращивания и идентификации микобактерий из различных диагностических биоматериалов усовершенствованными и разработанными нами новыми методами микро – и макрокультивирования позволяют упростить, значительно сократить сроки и повысить эффективность бактериологической диагностики туберкулеза и организации целенаправленного проведения противотуберкулезных мероприятий, в короткие сроки получать значительное количество бактериальной массы микобактерий, наблюдать, в динамике, за формированием и ростом микро – и макрокультур микобактерий и морфологической изменчивостью их бактериальных клеток, в ранние сроки развития микобактерий – в течение первой недели

1.5 Основные положения, выносимые на защиту.

1 Метод экспрессной индикации и выделения микобактерий на плотных средах с жидким парафином,

2 Совершенствование бактериологических методов исследования на туберкулез,

3 Микрокультуры микобактерий в жидких средах накопления с твердым парафином,

4 Сравнение эффективности методов идентификации микобактерий

1.6 Апробация работы Материалы диссертационной работы доложены на ежегодных научных конференциях (2002 – 2007) и Международной научно-практической конференции, посвященной 80 – летию факультета ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет им КД Глинки» (Воронеж, 2006), 54-й научно-практической конференции «Актуальные проблемы науки в АПК» (КГСХА, Кострома, 2002), Международной научно-практической конференции, посвященной 60 – летию ГНУ Краснодарского НИВИ (Краснодар, 2006), Международной научно-практической конференции «Экологические аспекты в животноводстве и патологии животных» (УОВГАМ, Витебск, 2007), международных научно-практических конференциях молодых ученых «Вклад молодых ученых в решение проблемы аграрной науки» (ВГАУ, Воронеж, 2005 – 2007)

1.7. Публикации результатов исследований По теме диссертации опубликовано 15 научных работ. Из них в реферируемых изданиях ВАК 1. Получено положительное решение № 2006139239/13(042785) о выдаче патента на изобретение.

1.8. Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 159 страницах и включает введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов, выводы, практические предложения. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 5 рисунками. Библиографический список включает 361 наименование, в том числе 109 иностранных источников.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Работа выполнена в 2003 – 2007 гг на кафедре микробиологии и патанатомии ФГОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет им КД Глинки», в Воронежской областной ветеринарной лаборатории.

Объектом исследования служили биоматериалы от туберкулинположительного крупного рогатого скота и свиней из неблагополучных по туберкулезу двух хозяйств Воронежской области, культуры микобактерий, изолированные из этих биоматериалов, пробы навоза, искусственно контаминированные музейными штаммами микобактерий, музейные штаммы патогенных и непатогенных микобактерий, питательные среды, методы лабораторных исследований при туберкулезе.

В процессе выполнения работы отобрано более 200 проб биоматериалов от туберкулинположительных коров из неблагополучных по туберкулезу крупного рогатого скота хозяйств и 72 пробы из внешней среды, благополучной по туберкулезу фермы крупного рогатого скота, впоследствии искусственно контаминированные нами музейными штаммами

микобактерий. Из этих материалов выделено 60 культур микобактерий, из них идентифицировано, выборочно, 26, а также дополнительно 10 культур микобактерий с заранее известными видовыми характеристиками, любезно предоставленных нам сотрудниками Воронежской областной ветеринарной лаборатории.

В процессе работы использовали бактериологические методы исследования согласно «Наставлению по диагностике туберкулеза животных» (1986, 2002) и «Методам лабораторной диагностики туберкулеза» - ГОСТ 26072 – 89 (СТСЭВ 3457 – 81) параллельно с усовершенствованными известными и разработанными нами экспрессными методами. Поэтому посевы из биоматериалов производили как традиционными способами в питательную среду Левенштейна – Йенсена, так и параллельно в жидкие среды с парафиновыми дисками 5 % мясо-пептонный бульон, синтетическую минеральную среду (А), среду Сотона и баранью цитратную кровь (по Дыхно), а также разработанную нами среду – 5 % мясо-пептонный вазелиномасляный агар (5 % МПВМА) и среду Левенштейна – Йенсена с вазелиновым маслом.

Деконтаминацию исследуемых биоматериалов в сравнении, проводили обработкой их детергентами двумя способами.

1) перед посевом, в этом случае параллельно использовали: 4 % NaOH (Эрлик, 1969), стерильные 2 и 6 % растворы H_2SO_4 (Б.Л. Мазур, 1936, А.П. Аликаева, 1982) и раствор анолита – 2 (С.Г. Субботина, К.В. Куликов, 2000),

2) непосредственным добавлением детергентов в питательные среды, с последующим микрокультивированием в них микобактерий. При этом параллельно использовали 1 % раствор малахитовой зелени и раствор Люголя (по В.И. Гольшевой, 1989).

Обогащение исследуемых материалов микобактериями проводили или известным способом седиментации, или разработанным нами способом – путем приготовления средней пробы, за счет последовательно проводимой двойной седиментации всего образца биоматериала (лимфоузла), с полным ее использованием, посевом одновременно в 2 – 3 колбы с жидкой питательной средой накопления и яичные среды.

Морфологические и тинкториальные свойства микобактерий изучали согласно «Наставлению по диагностике туберкулеза животных» (2002) на плотной питательной среде, а также в микро- и макрокультурах микобактерий, выращиваемых на парафиновых дисках, параллельно в 4 жидких (вышеуказанных) питательных средах, различающихся не только по консистенции, но и по своему составу – полноценных, «голодных» и 5 % МПВМА.

В качестве тест-культур использовали штаммы микобактерий, полученных из музея ФГУ «Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов»: *Mycobacterium tuberculosis* № 192, *Mycobacterium bovis* № 14, *Mycobacterium avium* № 961 – 97, *Mycobacterium intracellulare* №

13 – N, Mycobacterium scrofulaceum № 13 – S, Mycobacterium fortuitum № 342 и Mycobacterium phlei № 6 – 78

Суспензии микобактерий готовили на стерильном физиологическом растворе по оптическому бактериальному стандарту

Идентификацию культур микобактерий проводили в первой или второй генерации роста, после накопления бактериальной массы с предварительной проверкой на чистоту визуально и микроскопией мазков по Циль – Нильсену. При этом за основу брали показатели по упрощенной схеме идентификации микобактерий согласно «Наставлению по диагностике туберкулеза животных» (2002) – скорость роста из биоматериалов и в субкультурах на яичных средах, способность пигментообразования на свету и в темноте, рост на яичных средах при 22 °С, 37 – 38 °С, 45 °С, рост на МПА, способность микобактерий к росту на яичной среде с салицилатом натрия, эмульгируемость, характер роста на яичной среде, ПЦР.

Дополнительно идентификацию проводили в различные сроки инкубирования микроскопическим методом по морфологическим свойствам микобактерий и их микро – и макроколоний, формирующихся на парафиновых дисках в жидких средах накопления, и окрашиваемых нами 0,2 % растворами анилиновых красок (нейтральрот, малахитовая зелень). При этом в первую неделю, всякий раз, окрашивание проводили путем извлечения парафинового диска и внесения его на 15 мин в стаканчики с растворами краски. Во вторую же неделю изучали окрашенные микро – и макроколонии и микобактерии, уже после внесения анилиновых красок в тех же концентрациях непосредственно в среду накопления, в сроки после первой недели инкубирования.

Во всех случаях морфологические и тинкториальные свойства микобактерий изучали при окраске по Циль – Нильсену и цитохимическими методами (по Вейксельбауму, Целлариусу, Циль – Поргессу, Скрябиной и в микрокультурах по Н. Erlich).

Подробные схемы опытов, методов и способов исследований изложены в соответствующих разделах диссертации.

Цифровые экспериментальные данные обработаны по методикам А Т Усовича, П Т Лебедева (1970) и Г Ф Лакина (1990)

2.2. Метод экспрессной индикации и выделения микобактерий на плотных средах с жидким парафином

С целью устранения существенных недостатков, присущих известным методам микро – и макрокультивирования микобактерий (длительность, недостаточная информативность, сложность, трудоемкость и др.) нами был разработан экспрессный культуральный метод индикации и выделения микобактерий, совмещающий в себе их микро – и макрокультивирование на плотных средах. Для этого к известным плотным средам, различным по составу и питательной ценности, добавляли разными способами жидкий парафин – вазелиновое масло и получали 1) агаризованную питательную среду – 5 % мясо-пептонный вазелиномасляный агар (5 % МПВМА),

приготавливаемый на основе стандартной питательной среды – мясо-пептонного агара (МПА) с добавлением к нему в процессе приготовления 5 % стерильного вазелинового масла, 2) яично – вазелиномасляную среду, для чего поверхность стандартной яичной питательной среды Левенштейна – Йенсена, которую приготавливали по общепринятой методике, за 60 минут до посева орошали в пробирках и чашках Петри стерильным вазелиновым маслом

Основными задачами нашего исследования являлись изучение возможности индикации и выделения микобактерий на этих экспериментальных средах и оценка результативности выявления микобактерий при параллельном их использовании, в сравнении с известным прямым посевом на стандартную, плотную среду Левенштейна – Йенсена (метод макрокультивирования) и в жидкую среду накопления – 5 % МПГБ с дисками из твердого парафина (метод микрокультивирования микобактерий), с последующим пересевом микроколоний микобактерий, сформировавшихся по краям дисков, аппликацией их или наложением самих дисков на поверхности агаризированной и яичной плотных питательных сред, содержащих жидкий парафин

Материалом для исследования служили 2 млрд суспензии на физиологическом растворе 7 музейных штаммов микобактерий, 15 проб биоматериала (средостенные лимфоузлы с типичными для туберкулеза изменениями) и 9 проб нестерильной смеси земли и навоза, искусственно загрязненных 2 млрд суспензиями 4 музейных штаммов микобактерий *Mycobacterium tuberculosis* № 192, *Mycobacterium bovis* № 14, *Mycobacterium avium* № 961 – 97, *Mycobacterium phlei* № 6 – 78, для чего к навеске в 1,0 г каждой пробы, отдельно, добавляли по 10 мл микобактериальной 2 млрд суспензии каждого из 4 использованных музейных штаммов микобактерий. Всего таким способом к использованию было подготовлено 36 проб нестерильной смеси земли и навоза, содержащих микобактерии разных видов.

Данные, полученные нами, свидетельствуют о том, что все испытанные питательные среды и культуральные методы можно использовать для выделения микобактерий из различных диагностических биоматериалов

В то же время, пользуясь экспрессным методом, сочетающим последовательно проводимые микро – и макрокультивирования микобактерий на дисках из твердого парафина, вначале в жидких, затем на плотных яичной и агаризированной средах, содержащих жидкий парафин, мы во всех случаях обнаруживали в мазках – соскобах с дисков уже через 60 мин от начала микрокультивирования флотированные на них микобактерии.

Через 24 ч инкубирования визуально видимый рост микобактерий отсутствовал, в то время как в мазках – соскобах наблюдали увеличение количества их бактериальных клеток. Иногда в этот срок удавалось наблюдать, как из одной или двух палочек отходило как бы боковое ветвление. В отдельных случаях к 48 ч встречалось войлокообразное скопление микобактерий. К концу первой недели инкубирования рост

микобактерий становился стабильнее и под микроскопом хорошо просматривались мелкие, изолированные их микроколонии, которые в более поздние сроки инкубирования были заметны и визуальны. При этом в мазках – соскобах и мазках – отпечатках, окрашенных по Циль – Нильсену, отмечали значительное количество как бактериальных, так и зернистых форм.

После микроскопического исследования диски с микроколониями микобактерий накладывали на поверхности 5 % МПВМА и среду Левенштейна – Йенсена, содержащую и не содержащую вазелинового масла, и подвергали дальнейшему инкубированию. Появление на дисках и вокруг них макроскопически видимого роста микобактерий отмечали уже через 24 – 72 ч.

Преимуществом данного метода последовательного, непрерывного микро – и макрокультивирования в жидких и плотных питательных средах, содержащих парафин, является возможность 1) сочетать микроскопический и культуральный методы за счёт проведения микро – и макрокультивирования микобактерий последовательно, в одном исследовании, 2) сократить сроки выявления медленно растущих микобактерий, 3) пересев микроколоний микобактерий с дисков твердого парафина, после недельного инкубирования на жидкой питательной среде, на плотные питательные среды, содержащие жидкий парафин, позволяет доразвивать их микроколонии до макроколоний при интенсивном накоплении биомассы микобактерий в первой генерации.

Анализ результативности выявления микобактерий разработанным нами экспрессным культуральным методом, с использованием жидкого парафина на основе плотных агаризированной и яичной питательных сред в сравнении с традиционным методом прямого посева на яичную питательную среду показал преимущества питательных сред с жидким парафином. Сроки появления начального роста на них установлены.

а) *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis* – в посевах музейных штаммов через 24 – 36 – 48 ч, в посевах диагностических биоматериалов (естественно и искусственно контаминированных различными микобактериями) – через 48 – 72 – 96 ч,

б) *Mycobacterium avium* – *intracellulare*, *Mycobacterium phlei* (во всех случаях) – через 24 – 36 – 48 ч.

Кроме ускоренного роста всех видов микобактерий отмечено обилие колоний на поверхности питательных сред и интенсивное накопление микобактериальной массы, в то время как длительность культурального исследования известным методом прямого посева на среду Левенштейна – Йенсена (без вазелинового масла) составляла 23 – 30 суток.

Перед яичными средами агаризированная среда (на основе МПА) имеет ряд преимуществ: она готовится из полусинтетических основ, что обеспечивает более стабильное качество и воспроизводимость результатов. При добавлении к ней вазелинового масла детекция микобактерий на ней, как и на яичной среде, возможна уже к 24 – 48 ч.

Достоинством агаризированной среды является также то, что она очень проста в приготовлении, доступна и экономична и позволяет устранить главный недостаток яичных питательных сред – их непрозрачность. Выбранное нами количественное соотношение вазелинового масла (5 %) в питательной среде МПА (100,0) и способы его внесения установлены экспериментально и являются оптимальными для получения высокой информативности результатов диагностических исследований. При этом весьма короткие (24 – 96 ч) сроки выявления начального обильного роста различных видов микобактерий из диагностических биоматериалов позволяют нам говорить о новом экспрессном методе микро – и макрокультивирования на плотных средах с жидким парафином. Использование его позволяет значительно сократить сроки установления диагноза на туберкулез и повысить его результативность в сравнении с использованием только рутинных бактериологических методов – бактериоскопией и культуральными исследованиями на известных яичных средах, что создает основу для своевременного и успешного проведения комплекса противотуберкулезных мероприятий.

Возможность вести наблюдение в живой неокрашенной культуре за развитием микобактериальной популяции открывает широкие перспективы применения этого метода для изучения биологических свойств возбудителя туберкулеза. Научная новизна этого метода подтверждена патентом.

2.3. Совершенствование бактериологических методов исследования на туберкулёз

При бактериологическом исследовании диагностических биоматериалов взятые пробы могут быть по своей природе или в процессе отбора контаминированы посторонней микрофлорой. Известные способы уничтожения последней (деконтаминация) предусматривают обработку диагностического биоматериала теми или иными химическими средствами, которые, убивая постороннюю микрофлору, в той или иной степени влияют и на жизнеспособность микобактерий. Поэтому выбор деконтаминанта и характер обработки любых диагностических биоматериалов в значительной степени определяют успешность и культуральную, и микроскопического методов выявления микобактерий туберкулеза.

В связи с этим нами были проведены исследования по испытанию некоторых химических реактивов и анилиновых красок, используемых в качестве детергентов, обеспечивающих, по мнению многих авторов, эффективную и экономную обработку разнообразных диагностических биоматериалов. При этом были определены основные задачи: 1) выявить более результативный и доступный детергент, повышающий эффективность очистки исследуемых биоматериалов с животноводческих ферм от посторонней микрофлоры, при снижении трудоемкости способа как в экспериментальных исследованиях на музейных штаммах патогенных и непатогенных микобактерий (*Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium phlei*), так и при обработке диагностических биоматериалов,

естественно контаминированных микобактериями, 2) изучить целесообразность использования отобранного детергента и способа обработки им диагностических биоматериалов для ускоренного выявления микобактерий методами микро – и макрокультивирования в жидких и плотных средах с парафинами, обеспечивающего оптимальный рост микобактерий при минимальном количестве проростов

Для решения поставленных задач обработку диагностических биоматериалов проводили параллельно двумя способами, используя различные концентрации изучаемых детергентов

1) очистка исследуемых биоматериалов перед посевом, отдельно

– 4 % NaOH (1 1),

– стерильным 2 % H₂SO₄,

– раствором анолита – 2,

2) очистка воздействием детергента в течение периода микрокультивирования, для чего добавляли в жидкую питательную среду накопления отдельно 1 % раствор малахитовой зелени и раствор Люголя

Материалом для исследования служили 9 проб нестерильного сухого навоза с территории фермы, благополучной по туберкулезу крупного рогатого скота. Из этих биоматериалов готовили навески в 1 г и каждую из них отдельно искусственно контаминировали микобактериями вышеперечисленных 3 музейных штаммов, в количестве 2 млрд микробных тел в мл физраствора, по оптическому бактериальному стандарту. Исследуемые растворы первых 3 детергентов добавляли к контаминированным микобактериями пробам навоза по 10 мл. После тщательного перемешивания и фильтрования фильтраты через 10 мин центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Осадок каждой пробы навоза засеивали на 3 пробирки со стандартной средой Левенштейна – Йенсена, в 2 чашки Петри с 5 % МПВМА и в 2 колбочки (50,0) с жидкой средой накопления – 5 % МПГБ с парафиновыми дисками. Два других детергента добавляли непосредственно в жидкую среду накопления 1 % раствор малахитовой зелени и раствор Люголя. Посевы выдерживали в термостате при 37 °С. Проведено 3 серии опытов. Интенсивность роста микобактерий в опытных материалах сравнивали с контролем, в котором материалом для посева служили те же использованные нами, но только в чистом виде, суспензии музейных штаммов микобактерий на стерильном физиологическом растворе в той же концентрации.

Сравнительные данные опытов показали, что все способы очистки диагностических биоматериалов с животноводческих ферм первыми тремя детергентами имеют относительно одинаковую результативность посевов и микроскопии. При этом нами не было выявлено снижения темпов роста и формирования микрокультур микобактерий на парафиновых дисках, по сравнению с контролем. Кроме того, установлено, что количество проростов после обработки 4 % NaOH обнаружено в 6 случаях (7,4 %), 2 % стерильным раствором H₂SO₄ и анолита – 2 соответственно, в 10 и 2 случаях (12,3 и 2,5 %) Микрорельеф проростов в основном был представлен спорными

палочковидными формами и плесневыми грибами. Анализ результатов исследований показал, что анолит – 2 сдерживает развитие такой банальной микрофлоры и повышает эффективность обработки им биоматериалов с животноводческих ферм в 3 – 5 раз в сравнении с использованием для этих же целей соответственно 4 % раствора NaOH и 2 % раствора H₂SO₄.

Аналогичные исследования провели на биоматериалах естественно контаминированных микобактериями туберкулеза – 15 лимфоузлах, имевших и не имевших специфические туберкулезные изменения, отобранные нами в условиях мясокомбината от туберкулинположительного крупного рогатого скота и свиней.

Анализ результатов параллельных исследований по высеваемости микобактерий туберкулеза из биоматериалов от животных показал, что тремя методами обработки выявили 79,2 % положительных посевов. При этом две пробы из 15 исследованных дали отрицательный результат во всех случаях, а на среде Левенштейна – Йенсена дополнительно отрицательный результат установлен в посевах биоматериалов еще 3 лимфоузлов.

Поэтому количество выделенных культур микобактерий на стандартной среде Левенштейна – Йенсена на 20 % было меньше, чем на двух других, параллельно использованных средах, на которых высеваемость микобактерий составила по 86,6 %. Все три способа очистки от посторонней микрофлоры диагностических биоматериалов от животных показали хорошую результативность посева и микроскопии.

Однако рост посторонней микрофлоры был обнаружен только на яичной среде и составлял от 1,1 % после обработки анолитом – 2, до 4,4 – 7,7 % после обработки соответственно 4 % NaOH и 2 % H₂SO₄.

В то же время было отмечено, что обработка диагностических биоматериалов анолитом – 2 и стерильным раствором серной кислоты уменьшает процент образцов с единичными микобактериями соответственно, на 9,5 и 7,5 % в сравнении с использованием 4 % NaOH, что повышает информативность микроскопии.

После проведения предварительной обработки вышеописанным способом обогащения – седиментацией исследуемые биоматериалы (также 9 образцов нестерильного навоза, контаминированного отдельно микобактериями 3 музейных штаммов), без предварительной их очистки от посторонней микрофлоры, вносили в среду накопления – 5 % МПГБ с парафиновыми дисками, содержащую отдельно вторые исследуемые детергенты 1 % стерильный раствор малахитовой зелени и раствор Люголя. Контролем служили 2 колбочки с этой же средой, но без добавления к ней обоих детергентов.

Анализ результатов исследования показал, что на контрольных питательных средах проросты были обнаружены во всех исследуемых образцах биоматериала. В то время на средах, в которые были добавлены отдельно растворы малахитовой зелени и Люголя, количество проростов составило соответственно 16,6 и 27,7 %.

Вместе с тем присутствие в среде накопления раздельно использованных нами этих 2 детергентов не влияло на скорость и характер роста микобактерий, что говорит об отсутствии их подавляющего действия на микобактерии. Поэтому после пересева микроколоний микобактерий, сформировавшихся на парафиновых дисках в жидкой среде накопления, наложением их на поверхность среды Левенштейна – Йенсена не наблюдалось изменения сроков и интенсивности накопления их бакмассы, типичных для этого метода выделения микобактерий в чистом виде.

2.4. Микрокультуры микобактерий в жидких средах накопления с твёрдым парафином

Используя метод микрокультур на твердом парафине в жидких средах накопления при проведении целого ряда исследований, мы всегда наблюдали морфологическую изменчивость микобактерий, которая особенно ярко была выражена в ранние сроки их развития. Результаты наших исследований согласуются с сообщениями авторов этого экспрессного метода микрокультивирования о том, что его использование позволяет наблюдать рост микобактерий в очень ранние сроки, когда он еще не заметен визуально.

При этом важно отметить, что в связи с замедленным ростом изучение морфологических и других свойств микобактерий обычно проводится в культурах после длительного их выращивания. Исходя из этого, благодаря экспрессному росту микобактерий на парафиновых дисках в жидких питательных средах, представляется возможность устранить дефекты известных методов посева – длительность, а это, в свою очередь, исключает возможность дегенеративных изменений микробных клеток под влиянием накопившихся продуктов обмена, препятствующих нормальному развитию микобактерий, что может привести к неправильным суждениям.

Исходя из вышесказанного мы проверили целесообразность использования этого экспрессного метода микрокультивирования для изучения изменения морфологических свойств микобактерий в зависимости от сроков их инкубирования и состава жидких питательных сред.

Материалом для наших исследований служили 20 средостенных лимфоузлов, с характерными для туберкулеза изменениями и без них, от коров с положительной реакцией на туберкулин.

Для выполнения поставленной цели использовали, в основном, известный принцип метода микрокультур в жидких средах накопления на твердом парафиновом носителе, но уже в модифицированном виде, усовершенствовав некоторые приемы его исполнения и применив такие, как щадящая очистка диагностических биоматериалов от посторонней микрофлоры и новый способ обогащения – осадок – «средняя проба». Для этого каждый лимфоузел измельчали целиком (или большую его часть) и после тщательного растирания в ступке с песком и физраствором полужидкие суспензии фильтровали и полностью разливали в несколько центрифужных пробирок. После центрифугирования 15 мин при 3000 об/мин осадки из всех центрифужных пробирок помещали в одну центрифужную

пробирку и еще один раз центрифугировали с детергентом анолит – 2 в том же режиме Последний осадок – «средняя проба») - является материалом для микрокультивирования, поэтому его весь вносили в 2 – 3 колбы со средой накопления Обсемененность микобактериями осадков (из всех исследуемых проб лимфоузлов) проверяли микроскопией (с окраской мазков по Циль – Нильсену) и только после обнаружения в них значительного количества микобактерий, исследуемые биоматериалы использовали для посева

Микрокультуры выращивали параллельно в 4 жидких питательных средах, различающихся по своему составу баранья цитратная кровь (ММ Дыхно), среда А (СГ Субботина), среда Сотона и 5 % МПГБ Из этих сред, по известной методике готовили среды накопления, разливая их по 10 мл в колбочки (по 2 – 3 на каждую среду) с внесением в них до 30 капель расплавленного твердого парафина, который застывал на их поверхностях в виде дисков, диаметром около 0,5 см каждый После этого под парафиновые диски вносили осадки центрифугаты Контролем служили суспензии 7 музейных штаммов микобактерий на стерильном физиологическом растворе, которые вносили под парафиновые диски, из расчёта 2 млрд микробных тел на 1 мл питательной среды Результаты посевов учитывали каждые 24 часа в течение 10 суток, для чего из колбочек бактериологической петлей доставали по 2 – 3 парафиновых диска, готовили мазки – соскобы и мазки - отпечатки, с последующей их окраской по Циль – Нильсену Кроме того, дополнительно доставали еще по 2 диска, опускали их в стаканчики с 0,2 % водным раствором нейтрального или малахитовой зелени на 10 минут Затем готовили мазки, раскладывая на предметных стеклах диски с окрашенными растворами анилиновых красок микроколониями, нижней поверхностью вверх и с помощью объектива 20х и окуляра 7х изучали под микроскопом морфологию колоний микобактерий, сформировавшихся по краям дисков в ранние сроки

Наблюдая за развитием микобактерий каждые 24 ч, установили, что все испытанные среды эффективны для микрокультивирования на твердом парафине Сроки индикации и формирования микро – и макроколоний были идентичны и в течение всего периода наблюдения (до 7 – 10 – 15 суток) не зависели от состава питательной среды Используемая нами трехкратная микроскопия позволила последовательно наблюдать за морфологическими особенностями микобактерий в ранние сроки их развития в микрокультурах

В момент посева в мазках, окрашенных по Циль – Нильсену, микобактерии имели форму слегка удлинённых (нитевидных) палочек, большей частью сегментированных В период микрокультивирования во всех случаях по краям дисков обнаруживали

– через 24 ч – микроколонию, состоящую соответственно из 3 – 5 и позднее (48 ч) до 10 - 12 сегментированных палочек,

– к 72 ч, в клетках микобактерий накапливалось уже значительное число черных зерен, количество которых постепенно все более нарастало и достигало своего максимума на 7-е сутки

К концу первой недели инкубирования микроколонии имели форму кучек разной величины, с неровными краями, равномерно окрашенных анилиновыми красками в период инкубирования, в некоторых случаях с отростками или в виде переплетающихся нитей (сеточки) Микроскопическая картина микрокультур в этот период изменялась вместо удлиненных палочек (нитей) микрокультуры состояли из коротких, коккоподобных гомогенных палочек микобактерий, среди которых местами обнаруживали единичные уцелевшие сегментированные нитевидные клетки (удлиненные палочки) с черными зёрнами

Палочковидные, коккоподобные гомогенные формы микобактерий можно было обнаружить, хотя в незначительном количестве, уже через 3 – 4 суток микрокультивирования, после того как в палочковидных формах появились в большом количестве черные зерна

После того как микроколония уже состояла из коротких, кокковидных палочек, на 10-е сутки в клетках микобактерий опять появилась мелкая зернистость. Вероятно, этот полиморфизм микобактерий тесно связан с процессом их адаптации и размножения

К концу срока наблюдения, на 7 – 10 – 15-е сутки инкубирования (в зависимости от вида микобактерий), микроколонии увеличивались настолько, что часто их можно было обнаружить макроскопически по краям дисков в виде мелких серо – желтых колоний

Таким образом, метод микрокультур в средах накопления в усовершенствованном нами варианте, со щадящими и эффективными приемами очистки от посторонней микрофлоры и обогащения микобактериями исследуемых диагностических биоматериалов методом двойной седиментации, одновременно внесённых в 2 – 3 колбы с жидкой средой накопления, с последующим инкубированием микобактерий на парафиновых дисках эффективен, прост и доступен в исполнении и пригоден для ранней бактериологической диагностики туберкулеза, так как позволяет не только обнаружить за очень короткие сроки, формирующиеся по краям парафиновых дисков микроколонии микобактерий, но и изучать морфологические особенности микроколоний и бактериальных клеток микобактерий в них в течение первой недели инкубирования или другие сроки, необходимые исследователю для этих наблюдений

2.5. Сравнение эффективности методов идентификации микобактерий

Главная задача бактериологической лаборатории заключается в скорейшем выделении культуры микобактерий и ее идентификации. Однако выполнение классических культуральных и биохимических методов дифференциации и идентификации, ввиду своеобразия биологических свойств микобактерий, дорого, длительно, трудоемко и не всегда эффективно. При определении реального времени, которое проходит с момента посева диагностического биоматериала до получения результатов идентификации нетуберкулезных микобактерий, установлено, что первые 3 месяца идентифицируется только 7 % культур, еще 54 % - в период от 4 до 6

месяцев Кроме того, на традиционно используемых для этих целей яичных средах, с учетом характера исследуемых биоматериалов с животноводческих ферм, растут не только микобактерии туберкулеза, но и родственные микроорганизмы (нокардии, родококки и др.), поэтому при выделении культуры в чистом виде необходимо обязательное определение её родовой принадлежности и идентификации до вида (О А Нестеренко с соавт., 1985, Т Ф Отген, 1985, 1986, 1997, И В Эфендиев, Р А Нуратинов, 2005 и др.)

Исходя из вышеизложенного целью данной работы явилось изучение эффективности и возможности совместного использования по предлагаемой нами схеме некоторых известных нормативных культуральных методов в комплексе с разработанными нами доступными и простыми методами микрокультивирования, обеспечивающими быструю и адекватную этиологическую диагностику микобактериозов

Для достижения поставленной цели выборочно исследовали 26 полевых культур, в том числе 15 – выделенных из биоматериалов от туберкулинположительных коров, 3 – от свиней, 8 – из проб земли и навоза, искусственно контаминированных патогенными и непатогенными музейными штаммами микобактерий, и 7 культур музейных штаммов микобактерий для контроля

При этом первичную дифференциацию и идентификацию микобактерий провели на основании изучения их морфо-культуральных свойств по схеме, включающей три этапа исследований

1 Родовая идентификация, основанная на кислото-щелочеспиртоустойчивости микобактерий туберкулеза,

2 Дифференциация микобактерий туберкулеза от нетуберкулезных, основанная на способности последних расти на питательных средах с добавлением салицилата натрия,

3 Видовая идентификация, которая основана на бактериологических свойствах микобактерий туберкулеза (определение скорости роста, способности образовывать пигмент и расти при различных температурах)

Для подтверждения полученных предварительных результатов определения по этой схеме видовой принадлежности культур микобактерий параллельно использовали

1 Метод микрокультивирования микобактерий на твердом парафине, дополнив и усовершенствовав некоторые приемы его исполнения, с целью повышения результативности, достоверности и упрощения индикации и изучения особенностей морфологических признаков различных микобактерий в микрокультурах, окрашивая

– микобактерии по Циль – Нильсену и параллельно цитохимическими методами – по Вейксельбауму, Целлариус, Циль – Поргессу, Скрыбиной;

– микроколонии микобактерий, впервые, по Н Erlich – 0,1 % растворе щелочно – алкогольного аурamina, на 3 – 5 – 7-е сутки инкубирования,

2 0,2 % растворами анилиновых красок (нейтральрота или малахитовой зелени), внесенных в питательные среды к концу первой недели инкубирования,

3 Новый, разработанный нами экспрессный метод микрокультур на плотной агаризированной среде с 5 % вазелинового масла,

4 Молекулярно – биологический метод ПЦР

Анализ полученных нами результатов исследования показал, что использованная нами известная схема, включающая методы первичной дифференциации и идентификации микобактерий, позволяет с помощью простых и доступных методов определения морфологических и культуральных свойств, провести предварительную идентификацию некоторых наиболее часто встречающихся в практике видов микобактерий. Используя данную схему исследования, можно установить принадлежность выделенной культуры к патогенным, потенциально патогенным и непатогенным микобактериям, хотя на это затрачивается много времени из – за необходимости использования, во всех тестах неоднократного прямого посева на яичные среды

Отсюда 24 изучаемые нами полевые культуры микобактерий не пигментированные, растущие при температуре 37 – 38 °С на яичных средах без салицилата натрия более чем 20 суток, и не растущие на МПА, а также дающие рост при температуре 37 – 38 °С и 45 °С на яичных средах (включая среды с салицилатом натрия) через 10 и более суток, были предварительно определены нами как облигатно патогенные и потенциально патогенные. Такие культуры, согласно нормативным материалам, подлежат обязательно глубокому исследованию биологическим методом и комплексно сложными одновременно несколькими биохимическими методами, что, очень дорого, длительно, малодоступно практическим лабораториям и не всегда эффективно

Использование же усовершенствованных и разработанных нами методов микрокультивирования микобактерий на питательных средах с твердыми и жидкими парафинами исключает эти недостатки

Результаты наших исследований показали, что с помощью этих методов микрокультивирования возможно в весьма короткие сроки (от 60 минут и первые 3 суток) не только гарантированно выявить микобактерии из исследуемых диагностических биоматериалов, но и в ранние сроки инкубирования (от 3 – 7 до 10 – 15 суток) идентифицировать их в первой генерации по морфологическим свойствам микрокультур микобактерий, выращенных и окрашенных вышеописанными способами. При этом в ранние сроки (в первую неделю инкубирования) развитие этих микроорганизмов идет по-разному, и образующиеся микроколонии микобактерий разных видов отличаются между собой по морфологическим признакам. Образование микобактериями микроколоний в виде жгутов и чучек с неровной поверхностью является характерной морфологической особенностью, присущей вирулентным микобактериям. Атипичные и сапрофиты имеют тенденцию к диффузному войлокообразному росту и образованию

небольших рыхлых или слизистых кучек неправильной конфигурации, состоящих из полиморфных палочек.

Цитохимические методы и ПЦР являются экспрессными методами, однако их можно использовать как экспрессные дополняющие способы при идентификации микобактерий. Кроме того, методом ПЦР нами было установлено, что при длительном выращивании микобактерий – в течение 30 суток (срок наблюдения) их видовая специфичность не изменилась.

Полученные позитивные результаты идентификации предлагаемыми нами методами микрокультивирования на питательных средах различной консистенции, содержащих твердые и жидкие парафины, полностью подтвердили видовую принадлежность изучаемых микобактерий, установленную нами при использовании схемы первичной идентификации микобактерий по их морфо – культуральным свойствам.

В целом результаты проведенных нами и описанных в этом разделе исследований показали, что все испытанные нами методы могут с успехом применяться для видовой идентификации микобактерий. Для гарантированного получения наиболее достоверных результатов рекомендуем проводить идентификацию микобактерий комплексно, используя традиционные методы первичной дифференциации совместно с разработанными нами методами микрокультивирования на различных по консистенции питательных средах с жидкими и твердыми парафинами. Последние по чувствительности не уступают классическим микроскопическим и культуральным методам, но в то же время позволяют в относительно короткие сроки инкубирования не только выявить микобактерии и накопить значительное количество их бактериальной массы, но и в первой генерации провести идентификацию их по морфологическим и культуральным свойствам в ранние сроки развития их в микрокультурах. Считаем необходимым отметить, что все методы предлагаемого комплекса исследований дополняют друг друга, просты в исполнении, экономичны и доступны к применению в малооснащенных лабораториях.

Выводы

1 Для быстрой индикации, выделения и идентификации микобактерий в различных диагностических биоматериалах, с целью полного выявления источников и резервуаров возбудителя на животноводческих фермах, неблагополучных по туберкулезу, могут служить

а Разработанный нами экспрессный метод микро – и макрокультивирования микобактерий на плотных питательных средах, разных по составу и питательной ценности, содержащих жидкий парафин

– 5 % мясо-пептонном вазелиномасляном агаре (5 % МПВМА), приготавливаемом на основе стандартной питательной среды – мясо-пептонного агара с добавлением к нему, в процессе приготовления, 5 % стерильного вазелинового масла,

– стандартной питательной среде Левенштейна – Йенсена, поверхность которой за 60 минут до посева орошена стерильным вазелиновым маслом

б Модифицированный нами экспрессный метод последовательно проводимого микро – и макрокультивирования микобактерий, вначале в жидкой питательной среде с твердым парафином (5 % МПГБ с парафиновыми дисками), а затем плотных (яичной, агаризованной) питательных средах, содержащих жидкий парафин

2 Метод микро - и макрокультивирования микобактерий на агаризованной питательной среде – 5 % МПВМА, обладает значительной разрешающей способностью и позволяет.

– изменить диапазон скорости и интенсивности роста и сократить время выделения первичных культур различных микобактерий

а) *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*

– в посевах музейных штаммов до 24 – 36 – 48 ч

– в посевах бактериоскопически положительных биоматериалов (от животных и с объектов животноводческих помещений) – до 48 – 72 – 96 ч

б) *Mycobacterium avium – intracellulare*, *Mycobacterium phlei*, в тех же условиях исследования до 24 – 36 – 48 ч

2.1 Преимуществом разработанной нами среды – 5 % МПВМА является то, что она доступна, экономична, проста в приготовлении и позволяет устранить главный недостаток яичных сред – их непрозрачность. Это дает возможность вести наблюдение в живой неокрашенной культуре за развитием микобактериальной популяции и открывает широкие перспективы для изучения биологических свойств возбудителя туберкулеза.

2.2 Выбранное нами количественное соотношение вазелинового масла (5 %) является оптимальным для повышения частоты индикации микобактерий при посевах биоматериалов, существенно сокращая скорости их выделения, роста и накопления бакмассы

2.3 Различий в качестве роста микобактерий в зависимости от способа внесения в питательную среду вазелинового масла – до автоклавирования (добавлением в процесс приготовления) или после автоклавирования (орошение ее перед посевом микобактерий) не установлено. Независимо от

способа его внесения питательные среды сохраняют влажность более чем на 2 – 3 недели дольше, чем среды без вазелинового масла

3 Изучение результативности индикации и выделения микобактерий на плотных питательных средах (яичной и агаризованной), содержащих вазелиновое масло, в сравнении с прямым посевом на стандартную среду Левенштейна – Йенсена и жидкую среду накопления – 5 % МПГБ с парафиновыми дисками, показало, что все испытанные среды и способы культивирования можно использовать для индикации и выделения микобактерий из различных биоматериалов В тоже время

3 1 Длительность культурального метода прямого посева на стандартной питательной среде Левенштейна – Йенсена составляла 23 – 30 суток, при этом отмечено скудное накопление микобактериями бакмассы. Орошение перед посевом поверхности этой плотной яичной среды вазелиновым маслом сокращает сроки выявления и накопления бактериальной массы микобактерий до 24 – 96 ч, что совпадает со сроками появления первичного их роста на 5 % МПВМА и твердом парафине в жидкой питательной среде.

3 2 Микро – и макрокультивирование микобактерий, вначале в жидкой питательной среде накопления (5 % МПГБ с твердым парафином), а затем плотных (яичной и агаризованной) питательных средах, содержащих жидкий парафин, позволяет

- сочетать микроскопический и культуральный методы за счет проведения микро – и макрокультивирования микобактерий последовательно в одном исследовании,

- сократить сроки выявления медленно растущих микобактерий в 3 и более раз,

- посев микобактерий путем наложения парафиновых дисков с микроколониями микобактерий, сформировавшихся на их нижних поверхностях в период инкубирования в жидкой питательной среде, на плотные среды, содержащие вазелиновое масло, позволяет не только доращивать их до макроколоний, но и обеспечивает значительное сокращение сроков выявления и накопления бакмассы микобактерий в первой генерации

4 Предпосевная обработка биоматериалов с животноводческих ферм при культуральном выявлении микобактерий туберкулеза отдельно, 4 % раствором NaOH, 2 % стерильным раствором H₂SO₄ и анолитом – 2 не влияет на сроки и интенсивность роста микобактерий и обеспечивает относительно равные, при совместном учете, результаты посевов и микроскопии.

4 1 Высеваемость микобактерий из биоматериалов с низкой степенью контаминирования на среде Левенштейна – Йенсена на 20 % ниже, чем на 5 % МПВМА и 5 % МПГБ с парафиновыми дисками, на которых этот показатель составил 86,6 %

4 2 Обработка патологического биоматериала анолитом – 2 и стерильным 2 % раствором серной кислоты уменьшает процент образцов с единичными микобактериями соответственно на 9,5 и 7,5 % в сравнении с

использованием 4 % NaOH, что повышает информативность микроскопии. Анолит – 2 – сдерживает развитие посторонней микрофлоры (споровые палочковидные формы, плесневые грибки) и повышает эффективность очистки исследуемых образцов в 3 и более раз в сравнении с использованием для этих целей соответственно 4 % NaOH и 2 % раствора H₂SO₄

5 Присутствие в жидкой питательной среде накопления – 5 % МПГБ с парафиновыми дисками в течение периода микрокультивирования (до 10 – 15 суток) 1 % раствора малахитовой зелени или раствора Люголя

1) снижает вероятность проростов посторонней микрофлоры соответственно в 6 и 4 раза,

2) не влияет на интенсивность и характер роста микобактерий на парафиновых дисках, что говорит об отсутствии подавляющего действия этих детергентов в данной концентрации

Поэтому после посева микроколоний микобактерий, сформировавшихся на парафиновых дисках в жидкой среде накопления, наложением их на поверхность среды Левенштейна – Йенсена не наблюдалось изменения сроков и интенсивности накопления их бакмассы, типичных для этого метода выделения микобактерий в чистом виде

6 Новый способ обогащения – двойная седиментация с получением осадка – «средняя проба», с одновременной очисткой его анолитом – 2, позволяет увеличить концентрацию микобактерий за счет уменьшения объема исследуемого образца биоматериала, очистить от посторонней микрофлоры и полностью использовать осадок для посева, внося его в 2 – 3 колбы с жидкой средой накопления, что значительно повышает эффективность бактериоскопии и микрокультивирования

7. Микрокультивированием микобактерий на парафиновых дисках в сравнении в 4 жидких питательных средах, различающихся по составу (баранья цитратная кровь, синтетическая минеральная среда, среда Сотона и 5 % МПГБ), установлено, что все использованные среды пригодны для наблюдения за развитием микобактерий от 24 ч до 7 – 10 суток (сроки наблюдения) При этом сроки индикации и формирования микро – и макроколоний были идентичными в течение первой недели и не зависели от состава питательной среды

8 Метод микрокультур на парафиновых дисках в усовершенствованном нами варианте, со щадящими и эффективными приемами очистки от посторонней микрофлоры и обогащения микобактериями исследуемых биоматериалов методом двойной седиментации, с последующим их инкубированием в жидких средах накопления позволяет.

– устранить дефекты известных методов прямого посева на элективные питательные среды – длительность, что, в свою очередь, исключает действие ряда неблагоприятных факторов. накопление продуктов обмена, старение культуры, распад клеток и др,

– наблюдать рост микобактерий в ранней стадии, когда он еще не заметен визуально,

– выявить присутствие микобактерий при незначительном содержании их в исследуемом биоматериале, когда известные методы исследования (бактериоскопия, а в некоторых случаях и прямой посев) дают, как правило, отрицательные результаты,

– наблюдать морфологическую изменчивость микобактерий, которая наиболее ярко выражена в ранние сроки развития – в течение первой недели микрокультивирования. Так, уже через 24 – 48 ч удавалось обнаружить формирующиеся по краям дисков микроколонии микобактерий, состоящие вначале из нескольких, а в более поздние сроки (48 ч) значительного количества интенсивно окрашенных по Циль – Нильсену сегментированных палочек. На всех питательных средах наблюдали, в основном, одинаковые морфологические формы микобактерий: зернистые фрагментированные, кокковидные палочки, отдельные зерна и как бы фрагменты слегка ветвящихся палочек.

9. Используемая нами известная схема первичной дифференциации и идентификации микобактерий позволяет, с помощью доступных методов определения морфологических и культуральных свойств, провести предварительную дифференциацию и идентификацию некоторых, наиболее часто встречающихся в практике видов микобактерий. Однако большинство из них трудоемки и их исполнение требует достаточно много времени, из-за необходимости использования почти во всех тестах неоднократного прямого посева на яичные среды.

10. Сочетание микрокультивирования микобактерий на парафиновых дисках с бактериоскопией: 1) мазков – соскобов и мазков, – отпечатков (окрашенных по Циль – Нильсену и цитохимическими методами), 2) микрокультур микобактерий, формирующихся на нижних поверхностях дисков и окрашенных растворами анилиновых красок (нейтральрот, малахитовая зелень), вносимых до 0,2 % концентрации в жидкую питательную среду к концу первой недели инкубирования, 3) микрокультур микобактерий, сформировавшихся на парафиновых дисках и окрашенных на 3 – 5 – 7-е сутки инкубирования 0,1 % раствором щелочно – алкогольного аурамина, значительно упрощает процедуру и сокращает сроки проведения бактериологического исследования на микобактериозы различной этиологии, в сравнении с традиционными культуральными известными способами прямого посева и идентификации микобактерий с использованием яичных сред. Образование микобактериями микроколоний в виде жгутов и кучек с неровной поверхностью является характерной морфологической особенностью, присущей вирулентным микобактериям.

11. Комплексное использование традиционных морфо – культуральных бактериологических методов и разработанных новых и усовершенствованных нами методов микро – и макрокультивирования микобактерий в жидких и плотных питательных средах, дополняющих друг друга, позволяет достоверно и эффективно, в короткие сроки провести дифференциацию и идентификацию микобактерий, с определением их клинического значения.

12 Использование ПЦР, как дополнительного метода для подтверждения результатов идентификации, позволяет сократить сроки подтверждения диагноза на туберкулез до 5 – 6 ч. Кроме того, с его помощью нами установлено, что при длительном выращивании, в течение 30 суток (срок наблюдения) различных видов микобактерий на питательных средах, содержащих в своём составе твердые и жидкие углеводороды, видовая специфичность микобактерий от этого не изменяется.

Практические предложения

Для лабораторной диагностики туберкулеза предлагается

– новый экспрессный культуральный метод индикации и выделения микобактерий с использованием плотных питательных сред 1) 5 % мясо-пептонного вазелиномасляного агара (5 % МПВМА), приготовленного на основе стандартного мясо-пептонного агара (МПА) с добавлением к нему 5 % жидкого парафина – вазелинового масла, 2) элективных яичных питательных сред после орошения их поверхности за 60 минут до посева вазелиновым маслом,

– усовершенствованный экспрессный метод микро – и макрокультивирования микобактерий для индикации, выделения и изучения морфологической изменчивости, со щадящими и эффективными приемами очистки от посторонней микрофлоры (анолитом – 2) и обогащения микобактериями исследуемых биоматериалов методом двойной седиментации, с последующим их инкубированием вначале в жидких средах накопления на парафиновых дисках, а затем пересевом на плотные яичную и агаровую питательные среды, обогащенные вазелиновым маслом. Упрощенная схема дифференциации и идентификации микобактерий, за счет комплексного использования традиционных морфо – культуральных бактериологических методов совместно, с разработанными нами новыми методами микро – и макрокультивирования в сочетании с бактериоскопией

Список основных опубликованных работ по теме диссертации

1 Субботина С.Г. К методике индикации микобактерий в материалах с животноводческих ферм / С.Г. Субботина, Н.Г. Жмуров, И.В. Ливенцева, Н.Н. Жмуров // Сб работ 54 научно-практ. конф КГСХА «Актуальные проблемы науки в АПК» – Кострома, 2002 – С. 47 – 49

2 Субботина С.Г. Диагностическое значение микрокультур микобактерий / С.Г. Субботина, Н.Г. Жмуров, И.В. Ливенцева, Н.Н. Жмуров, О.В. Неруцков // Сб работ 54 научно-практ конф КГСХА «Актуальные проблемы науки в АПК» – Кострома, 2002. – С 50 – 51

3 Субботина С.Г. Культуральный метод экспрессной диагностики туберкулеза / С.Г. Субботина, Н.Г. Жмуров, И.В. Ливенцева, Н.Н. Жмуров // Сб работ научно-практ конф ВГАУ «Актуальные вопросы технологии животноводства, товароведения и ветеринарной медицины» – Воронеж, 2004, Вып 2 – С 94 – 97

4 Жмуров НН Метод микрокультур в бактериологической диагностике туберкулеза / НН Жмуров // Материалы межрегион науч - практ конф молодых ученых «Вклад молодых ученых в решение проблем аграрной науки» – Воронеж, 2005. – С 148.

5 Субботина СГ предпосевная обработка патологических материалов с животноводческих ферм при культуральном выявлении микобактерий туберкулеза / СГ Субботина, НГ Жмуров, НН Жмуров // Материалы Международ научно-практ. конф, посвященной 80-летию ФВМ ФГОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет им. КД Глинки» «Актуальные проблемы диагностики, терапии и профилактики болезней домашних животных» – Воронеж, 2006 – С. 49 – 51

6 Субботина СГ. Микрокультуры микобактерий на жидких средах накопления / СГ Субботина, НГ Жмуров, ИВ Ливенцева, НН Жмуров // Материалы международ научно-практ конф, посвященной 80-летию ФВМ ФГОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет им КД Глинки» «Актуальные проблемы диагностики, терапии и профилактики болезней домашних животных» – Воронеж, 2006 – С 64 – 66

7 Субботина С.Г. О диагностическом значении микрокультур туберкулезных микобактерий / СГ Субботина, НГ Жмуров, НН Жмуров, КВ Куликов // Материалы Международ. научно-практ. конф, посвященной 60-летию ГНУ Краснодарского НИВИ «Актуальные проблемы ветеринарии в современных условиях». – Краснодар, 2006 – С 224 – 226

8 Субботина СГ. Изучение изменчивости микобактерий туберкулеза в очагах на месте первичной локализации / СГ Субботина, НГ Жмуров, НН Жмуров, ОА Сапожкова, КВ. Куликов // Ученые записки УО ВГАМ «Экологические аспекты в животноводстве и патологии животных» – Витебск, 2007, Том 42, Вып.2. – С 222 – 224

9 Субботина СГ Разработка методов выделения микобактерий в чистом виде / СГ Субботина, НГ Жмуров, НН Жмуров, КВ Куликов, ИВ Ливенцева // ФГОУ ВПО «Воронежский госагроуниверситет» – Воронеж, 2007 – 10 с. – Рус – Деп в ВИНТИ 13.08.07 № 812 – В 2007

10 Субботина СГ Совершенствование бактериоскопического метода для индикации микобактерий в различных биоматериалах с животноводческих ферм / СГ Субботина, НГ Жмуров, НН Жмуров, ОА. Сапожкова // ФГОУ ВПО «Воронежский госагроуниверситет» – Воронеж, 2007 – 9 с – Рус. – Деп в ВИНТИ 13 08 07 № 810 – В 2007.

11. Субботина СГ Экспрессные цитохимические тесты определения жизнеспособности и идентификации микобактерий туберкулеза / СГ Субботина, НГ Жмуров, НН Жмуров, ОА Сапожкова // ФГОУ ВПО «Воронежский госагроуниверситет». – Воронеж, 2007. – 8 с – Рус – Деп в ВИНТИ 13 08 07 № 811 – В 2007

12 Жмуров НН Сравнительная эффективность методов индикации микобактерий / НН. Жмуров // Мат Всероссийской науч-практ конф молодых ученых «Достижения молодых ученых – будущее в развитии АПК» – Воронеж, 2007 – С 85.

13 Субботина С Г Метод экспрессной бактериологической диагностики туберкулеза / С Г Субботина, Н Г Жмуров, Н.Н Жмуров // Информ листок Воронежского ГРНТИ – Воронеж, 2007 – 6 с

14 Субботина С Г Ускоренный культуральный метод индикации и выделения микобактерий / С.Г. Субботина, Н Г Жмуров, Н Н Жмуров // Животноводство России. – 2008 - № 3. – С. 41 – 42.

15 Субботина С Г Способ выделения микобактерий / С Г Субботина, Н Г Жмуров, Н Н Жмуров // Положительное решение формальной экспертизы на изобретение № 2006139239/13(042785)

Подписано в печать 2 04 2008 г Формат 60x84¹/₁₆ Бумага кн -журн
П л 1,0 Гарнитура Таймс Тираж 100 экз Заказ № 1141
Типография ФГОУ ВПО ВГАУ 394087, Воронеж, ул Мичурица, 1