

На правах рукописи

**СВИРИДЕНКО  
НАТАЛЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА**

**ПРИМЕНЕНИЕ ОЗОНА В БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ  
ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА**

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

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук



Новосибирск 2008

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных СО Россельхозакадемии

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор  
**Бажин Михаил Аристоклеви**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
**Аликин Юрий Серафимович**,  
кандидат ветеринарных наук,  
старший научный сотрудник  
**Донченко Николай Александрович**

Ведущая организация: **ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко Российской академии сельскохозяйственных наук**

Защита состоится «20» ноября 2008 г. в «13<sup>00</sup>» часов на заседании диссертационного совета Д.006.045.01 при Государственном научном учреждении Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии по адресу: 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, п. Краснообск, ГНУ ИЭВСиДВ, а/я 8, тел/факс (383) 348-44-62.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО Россельхозакадемии

Автореферат разослан «10» октября 2008 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Г.М. Стеблева

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Туберкулез остается одной из главных медико-ветеринарных проблем в мире. Среди инфекционных болезней людей и животных, одно из ведущих мест занимает туберкулез. Высокий уровень заболеваемости регистрируется повсеместно, в том числе и в странах, занимающихся разведением крупного рогатого скота. По данным А.Х. Найманова с соавт. (2004), в инфекционной патологии крупного рогатого скота туберкулез занимает второе место после лейкоза и составляет 11,4%.

Успех борьбы с туберкулезом во многом зависит от своевременной постановки диагноза. Решающая роль в системе противозoonотических мероприятий при туберкулезе животных принадлежит диагностике. В связи с этим разработка и совершенствование способов, повышающих эффективность лабораторной диагностики, продолжается со времени обнаружения «бактерий Коха» и является весьма актуальным, до настоящего времени.

Индикация микобактерий включает в себя микроскопический, культуральный и биологический методы, каждый из которых имеет свои недостатки и преимущества (А.И. Каграмманов, 1959; В.И. Гольшевская, Т.Т. Попеску, 1989; Г.Ф. Коромыслов, 1998).

Наиболее чувствительным методом выделения микобактерий по праву считается культуральный, позволяющий получать результаты, даже при минимальном количестве возбудителя туберкулеза в исследуемом материале.

В связи с тем, что туберкулез человека и животных и по сей день является огромной проблемой, целесообразно совершенствование микробиологической диагностики туберкулеза, направленное на повышение чувствительности известных традиционных методов и разработку новых, ранее не используемых в микробиологической практике.

Разработка, усовершенствование бактериологической диагностики туберкулеза и внедрение ее в научных и практических учреждениях ветеринарии и медицины является весьма актуальной.

**Цель и задачи исследований.** Цель работы: усовершенствование бактериологической диагностики туберкулеза с применением озона для стимуляции скорости и интенсивности роста микобактерий.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить видовой спектр микобактерий, изолированных от крупного рогатого скота и объектов внешней среды, определить оптимальную концентрацию озона для стимуляции роста.

2. Изучить влияние оптимальной концентрации озона для стимуляции скорости и интенсивности роста микобактерий туберкулеза, выделенных из биологического материала морских свинок и крупного рогатого скота.

3. Изучить действие озонированного физиологического раствора *in vivo* на высеваемость микобактерий туберкулеза.

411

4. Изучить культурально-морфологические, биохимические и патогенные свойства культур микобактерий во второй генерации, при культивировании их с озонированным физиологическим раствором.

**Научная новизна.** Определен видовой состав микобактерий, циркулирующих в хозяйствах Омской области с различной эпизоотической ситуацией по туберкулезу. Изучены культурально-морфологические, биохимические и патогенные свойства культуры *M.bovis*, шт. 14 (ВНИИБТЖ).

Впервые разработан способ культивирования микобактерий с использованием озонированного физиологического раствора.

Установлена оптимальная концентрация озона, позволяющая сократить сроки появления и повышающая интенсивность роста микобактерий туберкулеза из биологического материала.

Впервые определены оптимальные условия применения озона *in vitro* и *in vivo* для повышения высеваемости микобактерий из биологического материала.

Изучены культурально-морфологические свойства культур, обработанных озоном, определена патогенность и вирулентность после воздействия на них озона.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты исследований по определению видового спектра микобактерий, изолированных от крупного рогатого скота и объектов внешней среды обитания, создают в хозяйствах Омской области основу дифференцированного проведения противотуберкулезных мероприятий как профилактических, так и оздоровительных. Полученные данные свидетельствуют, что проблема ликвидации туберкулеза животных, в частности крупного рогатого скота, не может быть полностью решена без учета роли среды обитания животных.

Разработанный способ культивирования микобактерий с использованием озонированного физиологического раствора ускоряет и повышает интенсивность роста микобактерий в 1,8-2 раза и может быть использован в ветеринарных бактериологических и научных лабораториях.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета ВНИИБТЖ (2004-2008 гг.), Международном научно-практическом конгрессе «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» (г. Санкт-Петербург, 2005); Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины продуктивных и непродуктивных животных» (г.Омск, 2005); Межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 85-летию СибНИВИ-ВНИИБТЖ (г.Омск, 2007); Межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 180-летию аграрной науки Сибири (г.Омск, 2008).

**Публикация материалов исследований.** По материалам диссертации опубликовано 9 научных статей, в том числе одна в научном журнале, ре-

комендованном ВАК Минобразования РФ («Сибирский вестник сельскохозяйственной науки»).

**Внедрение результатов исследований.** По результатам исследований разработаны методические рекомендации «Использование озона при культивировании микобактерий туберкулеза» утвержденные ученым советом ГНУ Всероссийский НИИ бруцеллеза и туберкулеза СО Россельхозакадемии (протокол № 2 от 18 апреля 2008) и подсекцией "Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока" отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол № 1 от 28 мая 2008).

Данные об использовании озона при культивировании микобактерий туберкулеза животных используются в учебном процессе при изучении курса эпизоотологии и микробиологии в Институте ветеринарной медицины ОмГАУ.

На основании результатов исследований составлена заявка на изобретение "Способ культивирования микобактерий", получена приоритетная справка № 2008117497 от 30.04.08. и уведомление о положительном результате формальной экспертизы от 10.06.08.

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 127 страницах компьютерного набора и включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, практические предложения и приложение. Список литературы представлен 324 источниками, в том числе 274 отечественных и 50 зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 22 таблицами, 3 рисунками.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Видовой спектр микобактерий, изолированных от крупного рогатого скота и объектов внешней среды из хозяйств Омской области.
2. Способ культивирования микобактерий туберкулеза с использованием озонированного физиологического раствора.
3. Культурально-морфологические и патогенные свойства культур микобактерий, полученных с применением озонированного физиологического раствора.

Автор выражает глубокую признательность и благодарность кандидату ветеринарных наук, заведующей лабораторией диагностики туберкулеза Н.С. Боганец за методическую помощь, научному сотруднику лаборатории диагностики туберкулеза Л.Т. Аппельганц, кандидату ветеринарных наук, заведующей сектором приготовления питательных сред А.Д. Панкратовой – за участие в выполнении некоторых фрагментов диссертации.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Материалы и методы исследований**

Работа выполнялась в 2004 - 2008 годах в лаборатории диагностики туберкулеза животных Государственного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза живот-

ных Сибирского отделения Россельхозакадемии и в хозяйствах Омской области с различной эпизоотической ситуацией по туберкулезу.

Исследования проведены в соответствие с тематическими планами НИР по заданиям:

- 02.01.09 «Разработать теоретические и практические основы молекулярно-генетической диагностики туберкулеза животных, индикации и идентификации микобактерий из различных объектов» (2001–2005 гг.).

- 08.01.04. «Создать систему иммунной защиты крупного рогатого скота от туберкулеза с применением молекулярных вакцин. Выявить молекулярно-генетические и иммунологические аспекты паразито-хозяйственных отношений при туберкулезе животных и обосновать ускоренную диагностику с учетом изменчивости свойств возбудителя» (2006–2010 гг.).

Бактериологические (микроскопический, культуральный, биологический методы) исследования проводили в соответствии с нормативно-технической документацией: «Методы лабораторной диагностики туберкулеза», ГОСТ 26072-89 (СТ СЭВ 3457–81), «Наставление по диагностике туберкулеза животных» (1986, 2002). Предпосевную обработку биологического материала от лабораторных животных и крупного рогатого скота осуществляли по методу Гона в модификации Левенштейна и Сумиоши.

Проводили сравнительное изучение информативности наиболее распространенных и часто используемых в ветеринарной бактериологической практике сред: Левенштейна-Йенсена, Финн-2, Гельберга, Фаст-3Л, Петраньяни и «Новая» с культурой *M. bovis* шт. 8, *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>, *M. avium* шт. 19, *M. fortuitum*.

Интенсивность роста культур оценивали в плюсах по методу Г.Н. Першина (1971).

Культурально-биохимические свойства изолированных кислотоустойчивых микобактерий изучали во второй генерации после накопления бактериальной массы, согласно методическим рекомендациям «Бактериологическая и биохимическая идентификация микобактерии», М.1981. Также использовали диагностические тесты согласно схеме дифференциации микобактерий, разработанной в ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко (1976) с учетом модификаций, предложенных А.Л. Лазовской, И.Н. Блохиной (1976), М.П. Зыковым, Т.Б. Ильиной (1972), Т.Б. Ильиной (1975, 1980), А.М. Кадочкиным (1979), Н.М. Макаревич с соавт. (1985). У ряда культур микобактерий изучали патогенность, вирулентность на различных видах лабораторных животных.

Биологическую пробу проводили на морских свинках, которых заражали подкожно в дозе 1 мг культур микобактерий в 1 мл физиологического раствора или 1 мл суспензии биологического материала.

Перед началом работы морских свинок, используемых в экспериментах, подвергали аллергическому исследованию ППД-туберкулином для млекопитающих. Биопробу проводили на животных, не реагирующих на

ПЖД-туберкулин. Ускоренную биологическую пробу выполнили по методике, представленной в описании к патенту № 226–54–03 «Способ ускоренной постановки биологической пробы на морских свинках в диагностике туберкулеза животных» (Н.С. Боганец, Ю.И. Смолянинов, А.Д. Панкратова, В.Г. Ощепков, 2005).

При патологоанатомическом исследовании проводили отбор проб биологического материала. Индекс пораженности туберкулезом внутренних органов разных видов лабораторных животных (белые мыши, морские свинки) определяли по методикам А.И. Тогуновой (1964) и Ю.К. Вейсфейлера (1975), М.В. Триус (1976), Feldman (1943).

Для проведения экспериментов исследованы 304 пробы биологического материала от крупного рогатого скота, реагировавшего на ПЖД-туберкулин. В работе использованы лабораторные животные: 240 беспородных морских свинок, живой массой 250–300 г. и 160 белых мышей живой массой 18–20 г., содержащихся в виварии с соблюдением правил и норм кормления (И.П. Западнюк и др., 1974), ухода и гуманного обращения.

Для изучения возможности применения озона в бактериологической диагностике туберкулеза в качестве ростостимулирующего средства, определяли его оптимальную концентрацию.

Исследования проводили с музейными культурами (*M.bovis* шт. 14 (ВНИИБГЖ), *M.tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> (ЦНИИТ МЗ)), эпизоотическими музейными штаммами культур *M.bovis*, биологическим материалом от морских свинок (40 голов) и от крупного рогатого скота, реагирующего на ПЖД-туберкулин для млекопитающих, из хозяйств Омской области с различной эпизоотической ситуацией.

В экспериментах использовали озонированный физиологический раствор. Озон получали на синтезаторе озона А-с-ГОКСФ-5-04-ОЗОН путем барбатирования озono-кислородной смесью стандартного физиологического раствора до необходимой концентрации.

Данные экспериментальных исследований обработаны методами математической статистики по методике, описанной А.Т. Усович, П.Т. Лебедевым (1970); Г.Ф. Лакиным (1990), рассчитывая средние значения ( $M \pm m$ ), достоверность разницы опытных и контрольных показателей ( $P$ ) с помощью программы Microsoft Excel.

Подробно схемы опытов, методы и методики исследований изложены в соответствующих разделах диссертации.

## **2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **2.2.1. Видовой спектр микобактерий, изолированных от крупного рогатого скота и внешней среды в Омской области**

Исследования по изоляции культур микобактерий выполнены с материалом от крупного рогатого скота из благополучных и неблагополучных

по туберкулезу хозяйств Омской области. Бактериологическим методом исследовано 249 проб биологического материала от реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота благополучных (171 проба) и неблагополучных (78 проб) по туберкулезу хозяйств (табл. 1). При этом от животных обеих категорий хозяйств изолировали 106 или 42,6% культур разных видов микобактерий.

От крупного рогатого скота неблагополучных по туберкулезу хозяйств изолировано 22 культуры (53,7%) *M.bovis*, что вполне закономерно для этой эпизоотологической категории. Вместе с тем одна культура *M bovis* выделена от реагирующей на туберкулин коровы, официально числящейся благополучной по туберкулезу фермы. В двух случаях (4,9%) причиной неблагополучия хозяйств явился возбудитель туберкулеза человеческого вида (*M.tuberculosis*).

Таблица 1 – Видовой спектр культур микобактерий из биоматериала от крупного рогатого скота хозяйств Омской области

Показатель	Категории хозяйств по туберкулезу		Всего
	неблагополучные	благополучные	
Исследовано проб	78	171	249
Изолировано культур, всего	41	65	106
– процент изоляции	52,6	38,0	42,6
Изолировано культур <i>M.bovis</i>	22	1	23
– процент изоляции	53,7	1,5	21,7
Изолировано культур <i>M.tuberculosis</i>	2	–	2
– процент изоляции	4,9	–	1,9
Изолировано культур атипичных микобактерий	9	51	60
– процент изоляции	21,9	78,4	56,6
Не идентифицировано культур	8	13	21
– процент не идентифицированных	19,5	20,0	19,8

В результате комплексных исследований (аллергические, патологоанатомические, бактериологические) с учетом культурально-биохимических свойств по всем тестам классификации из биологического материала от крупного рогатого скота хозяйств Омской области изолировали 60 культур атипичных микобактерий. При этом их количество в 5,6 раза превалировало в благополучных по туберкулезу хозяйствах с парааллергическим (неспецифическим) фоном сенсibilизации крупного рогатого скота к ППД-туберкулину для млекопитающих (78,4%). В 19,8% случаях изолированные культуры микобактерий идентифицировать не удалось.

Из представителей микобактерий 2 группы по классификации Раньона (скотохромогенные) изолирован 1 вид (*gordoniae*), 3 группы (нефотохромо-

генные) – 6 видов (*M.gastri*, *M.xenopi*, *M.terrae*, *M.triviale*, комплекса *M.avium-intracellulare*, *M.nonchromogenis*) и 4 группы (быстрорастущие атипичные) – 7 (*M.phlei*, *M.fortuitum*, *M.smegmatis*, *M.vaccae*, *M.diernhoferi*, *M.flavescens*, *M.perigrinum*). Из общего количества культур атипичных микобактерий, изолированных из биоматериала от крупного рогатого скота неблагополучных по туберкулезу хозяйств, выделены 14 видов культур. Фотохромогенные микобактерии 1 группы по классификации Раньона нами не выделены.

Наиболее распространенными в структуре атипичных микобактерий явились *M.phlei*, *M.perigrinum* – идентифицировано по 7 культур (11,7%), *M.smegmatis* – 6 культур (10,0%) и *M.fortuitum* – 5 культур (8,2%).

Бактериологическим методом (микроскопия мазков, посев на питательные среды, биопроба на лабораторных животных) исследовали 180 проб материала: соскобы и смывы со стен, полов, кормушек, кормовых проходов, почву, подстилочный материал, корма, воду. Изолированы 56 культур микобактерий (табл. 2).

Таблица 2 – Видовой спектр микобактерий, изолированных из объектов внешней среды обитания крупного рогатого скота благополучных по туберкулезу хозяйств Омской области

Вид микобактерий	Выделено культур	Классификация по Раньону, группа	Структура атипичных микобактерий, %
<i>avium-intracellulare</i>	3	3	5,4
<i>gordonae</i>	7	2	12,5
<i>vaccae</i>	1	4	1,8
<i>fortuitum</i>	14	4	25,0
<i>smegmatis</i>	17	4	30,4
<i>phlei</i>	4	4	7,1
<i>scrofulaceum</i>	5	2	8,9
не идентифицированы	5	-	8,9
ВСЕГО:	56	2-4	100,0

Анализ видового спектра изученных микобактерий показал, что в него вошли 7 представителей атипичных видов микобактерий. Сопоставление структуры видового состава показало, что 7 видов атипичных микобактерий, изолированных из объектов внешней среды, входят в состав видов, изолированных из биоматериала от крупного рогатого скота. Несмотря на то, что количественный состав выделенных видов меньше, из объектов внешней среды, дополнительно изолирована культура *M.scrofulaceum*, относящаяся ко 2-ой группе по классификации Раньона.

Наиболее часто изолировали следующие виды атипичных микобактерий: *M.smegmatis* (30,4%), *M.fortuitum* (25,0%) и *M.gordonae* (12,5%). Определенное эпизоотологическое значение имеют *M.scrofulaceum* (8,9%), *M.phlei* (7,1%), *M.avium-intracellulare* (5,4%) и *M.vaccae* (1,8%).

Полученные данные свидетельствуют, что проблема ликвидации туберкулеза животных, в частности крупного рогатого скота, не может быть полностью решена без учета проведения санитарно-профилактических мероприятий на животноводческих фермах и прилегающих к ним территориях.

## 2.2.2 Усовершенствование бактериологической диагностики туберкулеза

### 2.2.2.1 Изыскание оптимальной концентрации озона для стимуляции скорости и интенсивности роста музейных штаммов микобактерий на плотных питательных средах

Одним из направлений усовершенствования бактериологической диагностики туберкулеза является применение стимуляторов роста микобактерий, с этой целью использовали озон.

Опыты проводили на музейной культуре бычьего (*M.bovis* шт.14) и человеческого (*M.tuberculosis* шт.Н<sub>37</sub>R<sub>v</sub>) видов. Суспензию культур микобактерий в опытной группе готовили с помощью озонированного физиологического раствора. Физиологический раствор озонировали прямым барбатированием озono-кислородной смесью на синтезаторе озона А-с-ГОКСф-5-04-ОЗОН, предназначенного для получения озono-кислородной смеси с концентрацией озона на выходе аппарата до 50 мг/л из газообразного кислорода (ГОСТ 5583-78) путем электросинтеза. Синтезатор озона представляет собой автоматизированный прибор непрерывного действия. Концентрация озона в озono-кислородной смеси регулируется за счет изменения частоты питающего озонатор напряжения, а также за счет изменения расхода кислорода, продуваемого через озонатор.

В экспериментах использовали следующие концентрации озона: в первом варианте - 4 мг/л, во втором - 8 мг/л. В контрольных пробирках использовали стандартный физиологический раствор. Наблюдения за посевами проводили ежедневно до появления первичного роста, а затем каждые 7 дней.

Показатели скорости и интенсивности роста культур *M.bovis* шт.14 и *M.tuberculosis* шт.Н<sub>37</sub>R<sub>v</sub> представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Показатели роста культур микобактерий туберкулеза с применением озонированного физиологического раствора

Штамм	Концентрация озона мг/л	Скорость и интенсивность роста (дни)				
		7	14	17	21	30
<i>M.bovis</i> шт.14	4	+	++	+++	+++	+++
	8	+	+	+	+	++
	контроль	+	+	++	++	+++
<i>M.tuberculosis</i> Н <sub>37</sub> R <sub>v</sub>	4	++	++	++	+++	+++
	8	+	+	++	++	++
	контроль	+	++	++	++	+++

Примечание: + -1-50 колоний, ++ - 50-100 колоний, +++ - > 100 колоний.

Первичный рост во всех пробирках отмечали на 7 сутки, различной интенсивности. Обильный рост культур *M.bovis* шт.14 в опытных пробирках наблюдался на 17 сутки при концентрации озона 4 мг/л, по всей поверхности среды во всех пробирках колонии сухие, крошковатые, мелкие, типичные для данного вида. В контрольных пробирках на 7 сутки наблюдали скудный, а на 17-30, более обильный рост сухих, мелких, крошковатых колоний цвета слоновой кости, характерных для *M.bovis* шт. 14.

В опытах с чистой культурой *M.tuberculosis* шт.Н<sub>37</sub>R<sub>u</sub>, показатели скорости первичного роста на среде Левенштейна-Йенсена также отмечали на 7 сутки различной интенсивности.

Дополнительная обработка 50% опытных пробирок на 17 сутки озонированным физиологическим раствором в тех же концентрациях привела к замедлению накопления бактериальной массы в обоих вариантах по сравнению с контролем.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что однократная обработка озонированным физиологическим раствором с более низкой концентрацией озона (4 мг/л) приводит к увеличению интенсивности роста культур микобактерий как бычьего, так и человеческого видов. Повторная обработка озонированным физиологическим раствором замедляет интенсивность роста и образование новых колоний микобактерий.

В таблице 4 представлены результаты опыта по наблюдению за ростом *M.bovis* шт.14 на средах Левенштейна-Йенсена, Гельберга и Финн-2 с использованием озона в 4-х концентрациях (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 мг/л). В контрольных пробирках для приготовления суспензии культур использовали стандартный физиологический раствор.

Таблица 4 - Первичный и интенсивный рост *M.bovis* штамм 14 на плотных питательных средах с различной концентрацией озона

Концентрация озона, мг/л	Рост на питательных средах, сутки (M±m)					
	Левенштейна-Йенсена		Финн-2		Гельберга	
	первичный	интенсивный	первичный	интенсивный	первичный	интенсивный
0,1	16,0±0,44	21,8±0,49	13,6±0,98	22,6±0,40	12,6±1,03	21,2±0,49
0,25	5,8±0,37	13,0±0,63	6,0±0,44	12,8±1,15	5,8±0,37	12,4±1,07
0,5	6,0±0,31	12,2±1,12	6,0±0,44	12,8±1,15	5,8±0,37	12,2±1,15
1,0	17,2±0,37	23,6±0,4	роста нет	роста нет	13,2±0,91	25,6±0,6
контроль	13,2±0,97	22,2±0,49	8,83±0,6	21,0±0,54	8,0±0,89	21,8±0,49

На среде Гельберга начало роста отмечали на 5,8±0,37 сутки при концентрации озона 0,25-0,5 мг/л, что достоверно быстрее, чем на контрольных пробирках в 1,3 раза (8,0±0,89; p<0,01). При концентрации 0,1 и 1,0 мг/л

рост отмечали на  $12,6 \pm 1,03$  и  $13,2 \pm 0,91$  сутки соответственно, что в 0,6 раза позднее, чем в контроле ( $p < 0,001$ ).

При использовании озонированного физиологического раствора с концентрацией озона 0,25-0,5 мг/л накопление бактериальной массы в опытных пробирках отмечали на  $12,4 \pm 1,07$  -  $12,2 \pm 1,15$  сутки, что достоверно быстрее в 1,8 раза чем в контрольных ( $21,8 \pm 0,49$ ;  $p < 0,001$ ).

На среде Левенштейна-Йенсена появление первичного роста при концентрации озона 0,25-0,5 мг/л отмечали на  $5,8 \pm 0,37$  -  $6,0 \pm 0,31$  сутки, что достоверно быстрее, чем в контрольных пробирках в 2,3 раза ( $13,2 \pm 0,97$ ;  $p < 0,001$ ). При концентрации 0,1 и 1,0 мг/л рост *M.bovis* несколько замедляется и регистрируется на  $16,0 \pm 0,44$  и  $17,2 \pm 0,37$  сутки соответственно, что в 1,3 раза позднее, чем в контроле. Интенсивность роста культуры в опытных пробирках отмечали на  $12,2 \pm 1,12$ - $13,0 \pm 0,63$  сутки при использовании озона в концентрации 0,25-0,5 мг/л, что достоверно быстрее, чем в контроле в 1,8 раза ( $22,2 \pm 0,49$ ;  $p < 0,001$ ).

На среде Финн-2 в опыте начало роста при концентрации озона 0,25-0,5 мг/л отмечали на  $6,0 \pm 0,44$  сутки, что достоверно быстрее, чем в контроле в 1,5 раза ( $8,83 \pm 0,6$ ;  $p < 0,05$ ). Интенсивность накопления бактериальной массы при использовании озона в концентрации 0,25-0,5 мг/л значительно превышает показатели полученные в контрольных пробирках на  $12,8 \pm 1,15$  сутки в 1,6 раза быстрее, чем в контроле ( $21,0 \pm 0,54$ ;  $p < 0,001$ ).

Результаты опыта по наблюдению за ростом культуры *M.tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> на среде Левенштейна-Йенсена с использованием озона в 4-х концентрациях (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 мг/л) представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Интенсивность роста культуры *M.tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> на среде Левенштейна-Йенсена с различной концентрацией озона на 10 сутки

Интенсивность роста (колоний) (M±m)	Концентрация озона, мг/л				
	0,1	0,25	0,5	1,0	контроль
	16,75±1,7*	37,0±0,7***	33,25±1,4***	15,0±2,6*	21,5±0,6

Примечание: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,001$ ; \*\*\* -  $p < 0,0001$

Интенсивность накопления бактериальной массы культуры *M.tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> в момент появления первичного роста при использовании озона в концентрации 0,25 и 0,5 мг/л достоверно выше, чем в контроле ( $21,5 \pm 0,6$ ;  $p < 0,0001$ ).

Результаты проведенных исследований роста культур микобактерий показали, что концентрация озона 0,1 мг/л и 1,0 мг/л угнетает первичный рост ( $p < 0,05$ ), ( $p < 0,01$ ), тогда как концентрация озона 0,25 и 0,5 мг/л ускоряет появление ( $p < 0,001$ ) первичного роста и увеличивает интенсивность накопления бактериальной массы. Первичный рост регистрируется на 5-7 су-

тки, интенсивный на 10-12 сутки, а в контрольных пробирках соответственно: 10-15; 21-23 сутки.

В опытах по применению оптимальной концентрации озона использовали эпизоотические штаммы культур микобактерий, изолированные из биологического материала от крупного рогатого скота, реагировавшего на ППД-туберкулин для млекопитающих (табл. 6).

Таблица 6 - Интенсивность роста культур *M.bovis* на среде Левенштейна-Йенсена с применением озонированного физиологического раствора

№ п/п	Хозяйства, в которых выделены культуры	Интенсивность роста, (колоний) на 10 сутки (M±m)	
		+ озон (O <sub>3</sub> )	контроль
1	Ильинский	23,8±2,59***	6,33±1,2
2	Охотниковский	19,5±2,63***	8±0,58
3	Родина	12,75±5,31	6,67±2,4

Примечание: \*\*\* -  $p < 0,0001$

Первичный рост культур микобактерий туберкулеза отмечался на 10 сутки во всех пробирках с различной интенсивностью. В опытных пробирках интенсивность роста культур микобактерий составила от 12,75±5,31 до 23,8±2,59 колоний. В контрольных - от 6,33±1,2 до 8±0,58 колоний. Значительное накопление бактериальной массы в опытных пробирках по сравнению с контролем установлено на 20-21 сутки.

Таким образом, использование озона в концентрации 0,25 или 0,5 мг/л при культивировании микобактерий сокращает сроки выращивания микобактерий туберкулеза и повышает интенсивность накопления биомассы, при этом существенных различий в культивировании микобактерий на испытываемых питательных средах с использованием озонированного физиологического раствора не установлено.

#### **2.2.2.2. Воздействие оптимальной концентрации озона для стимуляции скорости и интенсивности роста микобактерий туберкулеза из биоматериала от морских свинок и крупного рогатого скота**

Для изучения воздействия оптимальной концентрации озона (0,25 мг/л) для индикации микобактерий из биоматериала от лабораторных животных были проведены эксперименты на 40 морских свинках, зараженных суспензией культуры *M.bovis* шт.14 в дозе 1 мг/мл. В течение всего опыта вели клинические наблюдения. На 5-6 сутки в месте введения культуры развился воспалительный инфильтрат, переходящий в дальнейшем в абсцесс. На 10 сутки увеличивались регионарные лимфатические узлы, достигающие через 30 дней размеров горошины. Абсцессы у морских свинок вскрывались на 10-12 сутки и

к 13-15 суткам на их месте появлялись хорошо выраженные язвы с казеозными массами.

Морским свинкам через месяц после заражения внутрибрюшинно ввели 1 мл стандартного ППД-туберкулина для млекопитающих, с целью воспроизведения анафилактического туберкулинового шока и ускорения гибели инфицированных животных.

При патологоанатомическом вскрытии определяли индекс пораженности для каждого животного и для группы. Показатель поражений оценивали в баллах по 4-балльной системе, устанавливали средний показатель путем вычисления средних арифметических величин из индивидуальных показателей. Средний показатель составил 18,6 баллов.

Посев биоматериала от морских свинок, зараженных культурой *M.bovis* штамм 14, на среду Левенштейна-Йенсена (по 10 пробирок) проводили по общепринятой методике (контроль) и с использованием озонированного физиологического раствора в концентрации 0,25 мг/л озона.

Первичный рост культур микобактерий в опытных пробирках регистрировался на  $11,7 \pm 0,2$  сутки, в контроле на  $19,4 \pm 0,23$  сутки ( $p < 0,001$ ), что достоверно быстрее в 1,7 раза (табл.7).

Интенсивность роста культур из биоматериала на 21 сутки в опытных пробирках, с использованием озонированного физиологического раствора, составила  $23,5 \pm 2,91$  колоний, что достоверно и в 2,8 раза выше, чем в контроле ( $8,28 \pm 1,24$ ;  $p < 0,0001$ ).

Таблица 7 - Рост культуры *M.bovis* шт. 14 на среде Левенштейна-Йенсена

№ п/п	Биоматериал от морских свинок, проба	Первичный рост, сутки (M±m)		Интенсивность роста, число колоний на 21 сутки (M±m)	
		+озон (O <sub>3</sub> )	Контроль	+озон (O <sub>3</sub> )	Контроль
1	№1	11,8±0,2	19,6±0,24	23,0±3,99	7,8±1,46
2	№2	11,8±0,2	19,4±0,24	21,6±2,01	10,2±0,99
3	№3	11,8±0,2	19,4±0,24	25,2±2,03	7,2±1,91
4	№4	12,0±0,01	19,2±0,2	27,0±3,05	9,0±1,22
5	№5	11,6±0,24	19,4±0,24	23,2±3,99	7,8±0,86
6	№6	11,4±0,24	19,4±0,24	21,8±2,96	9,8±0,66
7	№7	11,8±0,2	19,4±0,24	21,2±2,37	7,8±1,5
8	№8	11,8±0,2	19,6±0,24	23,6±2,16	9,4±0,86
9	№9	11,6±0,24	19,4±0,24	24,0±2,6	6,6±1,12
10	№10	11,6±0,24	19,2±0,2	24,4±3,93	7,2±1,83
Среднее по группе		11,7±0,2	19,4±0,23	23,5±2,91	8,28±1,24

Кроме этого исследовали 40 проб биологического материала от крупного рогатого скота из хозяйств с различной эпизоотической ситуацией, реагиовавшего на ППД-туберкулин для млекопитающих, параллельно двумя метода-

ми: общепринятым, согласно «Наставления по диагностике туберкулеза животных» (2002), и с использованием озона (табл. 8).

Таблица 8 – Результаты исследований проб биоматериала от крупного рогатого скота, реагирующего на ППД-туберкулин с применением озонированного физиологического раствора

№ п/п	Содержание озона (мг/л)	Количество проб	Изолировано культур	Сроки появления первичного роста (сутки)	% выделений
1	0,25	40	9	19,2±1,8	22,5
2	- контроль	40	4	24,25±4,46	10,0

При использовании общепринятого метода изолировали 4 культуры (10,0%), с использованием озонированного физиологического раствора 9 культур (22,5%).

Таким образом, при бактериологических исследованиях 40 проб биологического материала от крупного рогатого скота, реагирующего на ППД-туберкулин с использованием озона, удалось выделить в 2,25 раза больше культур микобактерий различных видов, чем при использовании общепринятого метода.

### **2.2.2.3. Использование *in vivo* озонированного физиологического раствора для повышения высеваемости из биологического материала от экспериментально зараженных морских свинок**

Воздействие озонированного физиологического раствора при низкой концентрации озона на микобактерии туберкулеза *in vitro* ускоряет скорость и повышает интенсивность роста высеваемых культур микобактерий, что позволило предположить о возможности использования озонированного физиологического раствора *in vivo*.

Морские свинки (40 голов) были заражены суспензией микобактерий *M. bovis* штамм 14 в дозе 1 мг/мл. Затем 30 морским свинкам на 7-й день после заражения вводили внутривентриально 5 мл озонированного физиологического раствора, содержащего 2 мг/л озона, введение проводили трехкратно с интервалом 7 дней, т.е. закончили через месяц после заражения. Десяти морским свинкам в контрольной группе озонированный физиологический раствор не вводили. На протяжении всего периода велись клинические наблюдения за опытными животными.

Развитие патологического процесса, степень поражения паренхиматозных органов зараженных животных определялись визуально с оценкой поражения по 4-х бальной шкале (описано выше).

Индекс пораженности органов у морских свинок с использованием озона *in vivo* составил в среднем по группе 10,2, в контроле – 18,9 баллов.

При этом высеваемость микобактерий была выше из биоматериала от морских свинок, зараженных *M.bovis* штамм 14 с внутрибрюшинным введением озонированного физиологического раствора.

#### **2.2.2.4. Культурально-морфологические, биохимические и патогенные свойства культур микобактерий, обработанных озоном**

Тинкториальные и морфологические свойства выделенных культур микобактерий изучали микроскопическим методом. Для этого готовили мазки из колоний, выросших с использованием озона, высушивали на воздухе, фиксировали над пламенем и окрашивали по Циль-Нильсену. Промывали, высушивали, просматривали мазок и устанавливали наличие кислотоустойчивости у микробов изучаемого штамма. Все культуры, идентифицированные как *M.bovis*, имели вид преимущественно прямых и изогнутых палочек различной длины, часто зернистых.

У изолированных кислотоустойчивых культур микобактерий, изучали культуральные свойства во второй генерации после пересева первичного роста на среде Левенштейна-Йенстена.

Определяя видовую принадлежность выделенных культур, отмечали отсутствие роста на среде Левенштейна-Йенсена с содержанием салицилата натрия и на среде с содержанием 5%-ного хлорида натрия, что характеризует *M.bovis*. Все прочие микобактерии дают пышный рост.

Для идентификации микобактерий проводили посев на среду Левенштейна-Йенсена и инкубировали при разных температурных режимах. Учет и регистрацию появления роста проводили в первые 10 суток - каждые 2-3 суток, в последующие 3 недели - каждые 5 дней. Отмечали рост колоний при температуре 37-38°C и отсутствие его при 22 и 45°C. При регистрации роста культур обращали внимание на сроки обнаружения первичного роста, характер роста, характеристику колоний.

Проведены исследования по изучению культурально-морфологических, биохимических, биологических свойств музейных и эпизоотических штаммов культур микобактерий, культивированных на средах с использованием озона, в результате которых было установлено: сроки обнаружения первичного роста музейных культур *M.tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>6</sub> и *M.bovis* штамм 14; штаммов культур выделенных от крупного рогатого скота, реагировавшего на ПИД-туберкулин для млекопитающих, в хозяйствах Омской, Тюменской и Новосибирской областей при температурном режиме (22; 37,5; 45°C) в опытных пробирках не отличались от контрольных. Характер роста на питательных средах, как в опытных, так и в контрольных пробирках был идентичен.

Тинкториальные свойства культур полученных с использованием озонированного физиологического раствора при окраске по Циль-Нильсену были сохранены. Присуща толерантность к 5%-ному хлориду натрия.

Для определения патогенных и вирулентных свойств микобактерий бычьего вида, обработанных озоном, проводили инфицирование морских свинок *M.bovis* в общепринятой дозе. Для заражения готовили суспензию культур микобактерий, выращенных на твердых питательных средах. Бактериальную массу снимали бактериологической лопаточкой, взвешивали на торсионных весах, помещали в стерильную ступку и тщательно растирали с небольшим объемом озонированного физиологического раствора с концентрацией озона 0,25 мг/л. Клинические наблюдения велись на протяжении всего периода. Морские свинки, инфицированные культурой *M.bovis*, обработанной озоном пали на  $48,2 \pm 1,6$  сутки, в контрольной группе на  $45,8 \pm 1,3$ , что свидетельствует о высокой вирулентности.

### 3. ВЫВОДЫ

1. В неблагополучных хозяйствах Омской области из биологического материала от крупного рогатого скота выделены культуры микобактерий: *M.bovis* (53,7%), *M.tuberculosis* (4,9%) и атипичных микобактерий (21,9%). В благополучных хозяйствах *M.bovis* (8,3%) и атипичных микобактерий (78,4%): *M.gordone*, *M.gastri*, *M.xenopi*, *M.terrae*, *M.triviale*, *M.avium-intracellulare*, *M.nonchromogenis*, *M.phlei*, *M.fortuitum*, *M.smegmatis*, *M.vacca*, *M.diernhofiri*, *M.flavescens*, *M.perigrinum*. В 19,8% случаях - культуры микобактерий не идентифицированы. Из объектов внешней среды и животноводческих помещений идентифицированы 7 видов атипичных микобактерий: *M.smegmatis*, *M.fortuitum*, *M.gordone*, *M.scrofulaceum*, *M.phlei*, комплекса *M.avium-intracellulare* и *M.vacca*.

2. Озонированный физиологический раствор, приготовленный на синтезаторе озона А-с-ГОКСФ-5-04-ОЗОН, при концентрации 0,25 или 0,5 мг/л ускоряет и повышает интенсивность роста микобактерий на плотных питательных средах в 1,8-2 раза.

3. Интенсивность роста изолятов культур микобактерий при культивировании их на плотных питательных средах с использованием озонированного физиологического раствора в 2-4 раза выше, чем при традиционном методе.

4. Первичный рост культур микобактерий, изолированных из биологического материала морских свинок, зараженных *M.bovis*, на среде Левенштейна-Йенсена с использованием озонированного физиологического раствора регистрируется на  $11,7 \pm 0,2$  сутки, без применения озона ( $19,4 \pm 0,23$  сутки), что в 1,8 раза позже.

5. Применение озонированного физиологического раствора, для изоляции культур из биологического материала от крупного рогатого скота из хо-

зьяйств с различной эпизоотической ситуацией, позволяет выявить в 2,25 раза больше культур, чем при общепринятом методе.

6. Озонированный физиологический раствор, введенный внутрибрюшинно инфицированным морским свинкам *M. bovis*, повышает высеваемость микобактерий туберкулеза из биологического материала в 2 раза.

7. Культуры *M. bovis*, культивированные с использованием озонированного физиологического раствора, во второй генерации сохраняют тинкториальные, культурально-морфологические, биохимические и патогенные свойства. Для культур микобактерий присуща устойчивость к 5% хлориду натрия, они не образуют пигмент на свету и в темноте, не растут на среде Левенштейна-Йенсена при температурах 22 и 45°C, проявляют рост при температуре 37-38°C, являются вирулентными для лабораторных животных.

#### 4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Определение видового спектра микобактерий, изолированных от крупного рогатого скота и среды его обитания, создают основу для разработки и проведения диагностических, оздоровительных и профилактических мероприятий.

2. Разработан способ культивирования микобактерий туберкулеза на плотных питательных средах с использованием озона.

3. Методические рекомендации "Использование озона при культивировании микобактерий туберкулеза", утвержденные ученым советом ГНУ Всероссийский НИИ бруцеллеза и туберкулеза СО Россельхозакадемии (протокол № 2 от 18 апреля 2008) и подсекцией "Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока" отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол № 1 от 28 мая 2008).

4. На изобретение "Способ культивирования микобактерий", получена приоритетная справка № 2008117497 от 30.04.08. и уведомление о положительном результате формальной экспертизы от 10.06.08.

5. Данные об использовании озона при культивировании микобактерий туберкулеза животных используются в учебном процессе при изучении курса эпизоотологии и микробиологии в Институте ветеринарной медицины ОмГАУ.

#### 5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ускоренный метод постановки биологической пробы на морских свинках в диагностике туберкулеза животных / Соавт.: Н.С. Боганец, Ю.И. Смолянинов, А.Д Панкратова и др. // Тез. докл. международ. науч.-практ. конгресса «Актуальные проблемы ветеринарной медицины». С.-Пб, 2005. — С. 51-52.

2. Изучение бактерицидного действия озона на рост культуры микобактерий туберкулеза / Соавт.: А.В. Лысов, Н.С. Боганец, А.П. Рахвалов и др. // Омский научный вестник. Актуальные вопросы инфекционной патологии. Матер. юбилейной науч.- практ. конф., посвящ. 75-летию кафедр инфекционных болезней взрослых и детей. Омск, 2005. №4 – С.63-64.

3. Видовой спектр микобактерий, изолированных от крупного рогатого скота и среды его обитания в регионе Сибири / Соавт.: Н.С. Боганец, Ю.И. Смолянинов, Н.М. Колычев и др. // сб. науч. тр. СО РАСХН. ВНИИБТЖ. 6-й межрегион. науч.-практ. конф. - Омск, 2006.- С. 18-23.

4. Характеристика культуры *M.bovis* шт.14 (ВНИИБТЖ) / Соавт.: Н.С. Боганец, Ю.И. Смолянинов, Л.Т. Апфельганц // сб. науч. тр. СО РАСХН. ВНИИБТЖ. 6-й межрегион. науч.-практ. конф. - Омск, 2006.- С.24-28.

5. Совершенствование бактериологической диагностики туберкулеза / Соавт.: Н.С. Боганец, Ю.И. Смолянинов, Л.Т. Апфельганц // сб. науч. тр. СО РАСХН. ВНИИБТЖ. 6-й межрегион. науч.-практ. конф. - Омск, 2006.- С.29-33.

6. Использование озонированного физиологического раствора в бактериологической диагностике туберкулеза / сб. науч. тр. СО РАСХН. ВНИИБТЖ. 6-й межрегион. науч.-практ. конф.- Омск, 2007.- С. 142-146.

7. Действие озона на рост микобактерий из биологического материала от морских свинок зараженных *M.bovis* / сб. науч. тр. СО РАСХН. ВНИИБТЖ. 7-й межрегион. науч.- практ. конф., посвящ. 180-летию аграрной науки Сибири – Омск, 2008.- С. 228-230.

8. Применение озонированного физиологического раствора в бактериологической диагностике туберкулеза / Соавт.: Н.С. Боганец, М.А. Бажин, Л.Т. Апфельганц // Развитие АПК Азиатских территорий. Тр. XI-й Междунар. науч.-практ. конф.- Новосибирск, 2008. – С.18-22.

9. Использование озона в бактериологической диагностике туберкулеза / Соавт.: Н.С. Боганец, Л.Т. Апфельганц // Сибирский вестник с.-х. науки. – Новосибирск, 2008. - №7.- С. 84-87.

---

Подписано к печати 06.10.2008. Формат бумаги 60x84 1/16.

Печать оперативная. Гарнитура Times New Roman

Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз.

Отпечатано с оригинал-макета

в типографии ООО «Вариант-Омск»

644043, г. Омск, ул. Фрунзе, 1, кор. 3, оф.13. Тел./факс: 211-600