

На правах рукописи

**БЕЛОБОРОВА  
АЛЕКСАНДРА АЛЕКСАНДРОВНА**

**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ  
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА  
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

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

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук



Новосибирск 2008

Работа выполнена в ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии, ФГОУ ВПО «Новосибирский государственный аграрный университет»

Научный руководитель кандидат ветеринарных наук  
старший научный сотрудник  
**Донченко Николай Александрович**

Официальные оппоненты доктор биологических наук, профессор  
**Аликин Юрий Серафимович,**  
доктор ветеринарных наук, профессор  
**Луницын Василий Герасимович**

Ведущая организация ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных  
СО Россельхозакадемии

Защита состоится «29» апреля 2008 г в 9<sup>00</sup> ч 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, СО Россельхозакадемия, ИЭВСиДВ

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО Россельхозакадемии

Автореферат разослан «11» апреля 2008 г

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Г М Стеблева

**Актуальность проблемы.** Туберкулез – инфекционное, хронически протекающее заболевание человека и животных, представляющее одну из первостепенных проблем здравоохранения и ветеринарии, приводящее к большим потерям среди поголовья сельскохозяйственных животных (М П Зыков, 1976, 1978, В П Шишков, В П Урбан, 1991, 1998, А С Донченко, 1998, Н А Шкиль, 1998)

Возбудитель – бактерии рода *Mycobacterium*, в который входит более 38 самостоятельных видов. Болезнь у животных вызывают микобактерии туберкулеза бычьего (*M bovis*), человеческого (*M tuberculosis*), птичьего (*M avium*) видов. Каждый из них является патогенным как для животных, так и для человека, возможно и перекрестное заражение (А С Донченко и соавт., 2002)

Отмечены трудности в выделении культур микобактерий туберкулеза на питательных средах (В И Голышевская и соавт., 1997) и, в связи с этим, отдельные авторы (Г М Николаева, 1995, К Duncan, 1997 и др.) рекомендуют больше внимания уделять современным методам диагностики: молекулярно-генетическим и иммунологическим. Иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция обладают высокой чувствительностью и специфичностью, позволяют обнаружить микобактерии в пробах биоматериала в короткие сроки (И Г Шемякин и соавт., 2000)

Несмотря на это, до сих пор выделение возбудителя на питательных средах остается основой лабораторной диагностики туберкулеза (А З Равилов, 1999). Бактериологический метод позволяет получать чистые культуры микобактерий туберкулеза и проводить их видовую идентификацию, определять биологические и биохимические свойства.

Трудности, связанные с выделением чистых культур микобактерий, обусловлены обсемененностью большинства анализируемых образцов микроорганизмами (сапрофиты, дрожжеподобные грибы, актиномицеты и др.), размножающимися значительно быстрее микобактерий. В связи с этим предложен ряд методов и препаратов для освобождения исследуемых проб от посторонней микрофлоры. Сведения об их эффективности крайне разноречивы (Р А Jenkins et al., 1982).

Изучение влияния сроков хранения проб биоматериала на жизнеспособность микобактерий вызывает научно-практический интерес.

Ряд исследователей сообщает о возможности использования при проведении бактериологических исследований в качестве лабораторной модели белых мышей, что снижает материальные затраты и время проведения исследований (ММ Дыхно и соавт, 1963, Н С Боганец, 2006) Однако, данных по изучению использования беспородных белых мышей для заражения микобактериями туберкулеза, а также пробами биоматериала от животных, недостаточно

Лабораторная диагностика туберкулеза до сих пор является наиболее трудоемкой и сложной, поэтому повышение эффективности ее проведения является актуальным.

**Цель и задачи исследований.** Цель работы повысить эффективность лабораторной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи

1 изучить возможность использования белых мышей в комплексе бактериологических исследований при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота,

2 провести анализ эффективности различных методов обработки и хранения проб биоматериала перед посевом их на питательные среды и отобрать более информативные для выделения различных видов культур микобактерий туберкулеза,

3 разработать компьютерную базу данных для учета полученных результатов лабораторных исследований при туберкулезе

**Научная новизна.** Впервые установлено, что включение беспородных белых мышей в комплекс бактериологических исследований позволяет повысить эффективность лабораторной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота

Выявлен оптимальный способ обработки проб биоматериала, определены сроки его хранения, повышающие эффективность проведения бактериологических исследований при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота

Разработана база данных «Электронный журнал учета культур», позволяющая проводить учет полученных результатов лабораторных исследований при туберкулезе

**Теоретическая и практическая значимость работы.**

Результаты исследований открывают возможность повышения эффективности лабораторной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота

## Разработаны

— методические рекомендации «Изоляция и индикация микобактерий туберкулеза из биоматериала животных», рассмотренные и утвержденные подсекцией «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины СО Россельхозакадемии (прот № 4, 2007);

— база данных «Электронный журнал учета культур» (свидетельство об официальной регистрации №2007 620301, 2007 г Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам)

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета ГНУ Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибирского отделения Россельхозакадемии (Новосибирск, 2004–2007), II-й Международной научно-практической конференции молодых ученых (Новосибирск, 2006), Международной научно-практической конференции молодых ученых (Омск, 2006)

**Публикация результатов исследований.** По теме диссертации опубликованы 5 научных работ, в том числе в журнале «Сибирский вестник сельскохозяйственных науки», рекомендованном ВАК РФ

## Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений Работа иллюстрирована 28 таблицами и 29 рисунками Список литературы включает 216 источников, в том числе 59 иностранных авторов

## Основные положения, выносимые на защиту:

1 Результаты изучения использования белых мышей в комплексе бактериологических исследований при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота,

2 Анализ эффективности различных методов обработки и хранения проб биоматериала перед посевом их на питательные среды,

3 Компьютерная база данных для обработки полученных результатов лабораторных исследований

Теоретический анализ, обобщение результатов, экспериментальные исследования выполнены автором самостоятельно

Автор выражает благодарность за участие в выполнении некоторых фрагментов диссертации заведующему лабораторией туберкулеза животных ГНУ ИЭВСиДВ СО Россельхозакадемии кандидату ветеринарных наук Н А Донченко, сотрудникам кандидату биологических наук В Н Донченко, кандидату биологических наук С В Иониной

## 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы и методы исследований

Работа выполнена в 2004–2008 гг в соответствии с планом НИР 08 01 02 «Разработать оптимальную комплексную систему диагностики, профилактики и оздоровления хозяйств от туберкулеза крупного рогатого скота» в лаборатории туберкулеза сельскохозяйственных животных ГНУ ИЭВСиДВ СО Россельхозакадемии, в институте ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «Новосибирского государственного аграрного университета»

Лабораторные исследования по изоляции микобактерий, последующей их идентификации, проводили в соответствии с методическими рекомендациями «Бактериологическая и биохимическая идентификация микобактерий» (Т Б Ильина, 1975, 1980), согласно «Наставлению по диагностике туберкулеза животных», утвержденному Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 18 ноября 2002, а также в соответствии с «Инструкцией по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза», утвержденной Министерством здравоохранения Российской Федерации №109 от 21 марта 2003

В опытах использовали следующие штаммы микобактерий *M bovis* (шт 14, СибНИВИ), *M tuberculosis* (шт erdman, ГНЦ ВБ «Вектор»), *M avium* (шт 419, НИВИ Нечерноземной зоны), *M smegmatis* (шт ВГНКИ), *M fortuitum* (шт ВГНКИ)

Посевы проводили на питательные среды Финн-2, «ИЭВСиДВ» и «Новая», Гельберга, Левенштейна-Йенсена

В работе использовали беспородных белых мышей (755 голов), кроликов (14), морских свинок (42) и кур (36 голов) Во время эксперимента животные находились в стандартных условиях содержа-

ния и кормления (В Н Василев, 1971) В каждую серию опытов включали контрольную группу животных (интактную) Бактериологические исследования проб биоматериала от белых мышей проводили на 15 и 30 сутки после заражения (I M Orme, F M Collins, 1986)

Всего исследовали 47 проб биоматериала от крупного рогатого скота, положительно реагирующего на введение ППД-туберкулина для млекопитающих, из хозяйств Новосибирской области

Биологический материал, отобранный от зараженных лабораторных животных, а также крупного рогатого скота, обрабатывали методом А П Аликаевой (ГОСТ 26072 – 89, СТ СЭВ 3457 – 81) и модифицированным методом, с использованием метода седиментации (Н А Донченко и соавт., 2004)

Культурально-биохимические свойства микобактерий туберкулеза изучали во второй генерации роста, после накопления бактериальной массы согласно «Наставлению по диагностике туберкулеза животных» (2002)

Достоверность результатов подтверждали путем статистической обработки с помощью критерия Стьюдента Результаты считали достоверными при  $P < 0,05$  (А Т Усович, П Т Лебедев, 1970) Для обработки полученных данных использовали программу «Microsoft Excel», входящую в пакет программ «Microsoft Office 7 0»

## **2.2. Результаты исследований**

### **2.2.1. Использование белых мышей в комплексе бактериологических исследований при туберкулезе крупного рогатого скота**

С целью определения оптимальной заражающей дозы, беспородных белых мышей инфицировали культурами микобактерий *M bovis* (шт.14), *M avium* (шт 419), *M smegmatis* и *M fortuitum* В опыте использовали два способа заражения внутривенный (в подхвостовую вену) и подкожный Суспензии культур вводили в дозах 0,1мл, 0,25мл и 0,5мл, разведенных по стандарту мутности  $10^5$  МЕ Пробы биоматериала от мышей высевали на питательную среду Финн-2

В результате внутривенного заражения белых мышей культурами микобактерий *M bovis* и *M smegmatis*, установили, что заражающая доза не влияет на скорость и интенсивность роста изолируемых

от мышей культур При подкожном заражении лабораторных животных *M bovis*, *M avium*, *M smegmatis* и *M fortuitum*, а также при внутривенном заражении *M avium* и *M fortuitum*, оптимальной заражающей дозой является 0,5 мл

Для того чтобы определить органы преимущественного накопления микобактерий туберкулеза в организме белых мышей, зараженных *M bovis*, нами было проведено бактериологическое исследование проб печени, селезенки, легких Посев суспензии, приготовленной из проб биоматериала, проводили на питательные среды Финн-2, «ИЭВСидВ» и «Новая» (табл 1)

**Таблица 1 - Рост культур *M. bovis* на различных питательных средах**

Орган	Финн-2		«ИЭВСидВ»		«Новая»	
	появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост
Легкие	9,4±0,96	12,1±0,99	9,0±0,47	10,9±0,875	10,2±0,63	12,0±0,67
Печень	9,0±0,47	11,2±1,33	8,6±0,84	10,8±0,63	9,3±0,82	11,7±0,48
Селезенка	9,3±0,82	12,1±0,57	9,4±0,69	11,0±0,67	9,9±0,88	11,8±0,78

Из органов мышей контрольной группы (интактные животные) микобактерии не выявлены

Таким образом, при заражении белых мышей *M bovis* изолированы микобактерии из всех исследованных органов

Для бактериологического исследования, в последующем, формировали объединенные пробы биоматериала (легкие, печень, селезенка) (табл 2)

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что после внутривенного заражения белых мышей, скорость роста культур *M bovis* (8-12 дней) достоверно ( $P < 0,01$  и  $P < 0,001$ ) выше и их характер более интенсивный, чем при подкожном инфицировании (14–22 дня) Изменения во внутренних органах (увеличение печени, селезенки) наблюдали у экспериментальных животных, зараженных внутривенным способом Установлено, что сроки роста культур, выделенных из проб биоматериала от белых мышей, отобранных на 15 и 30 сутки после заражения одинаковые

**Таблица 2 - Рост культур *M. bovis* на различных питательных средах в зависимости от способа заражения белых мышей**

Группа	Сроки убоя, сутки	Питательная среда					
		Финн-2		«Новая»		«ИЭВСидВ»	
		Рост, сутки					
		появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост
1 (контроль)	30	-	-	-	-	-	-
Внутривенное заражение							
2	15	9,4±0,96	11,2±1,31	9,8±0,63	12,1±0,99	7,8±0,63	10,2±0,63
3	30	9,0±0,47	10,9±0,88	11,2±1,33	12,1±0,57	9,3±0,82	10,8±0,79
Подкожное заражение							
4	15	15,8±0,78	18,5±0,84	18,0±1,05	19,6±0,69	15,4±1,07	17,8±1,03
5	30	15,3±0,95	18,0±0,67	18,1±0,57	21,4±1,26	14,1±1,10	15,5±0,71

Примечание «-» — нет роста

**Таблица 3 - Рост культур *M. avium* на различных питательных средах в зависимости от способа заражения белых мышей**

Группа	Сроки убоя, сутки	Питательные среды					
		Финн-2		«Новая»		«ИЭВСидВ»	
		Рост (сутки)					
		появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост
1 (контроль)	30	-	-	-	-	-	-
Внутривенное заражение							
2	15	9,4±0,97	11,9±0,57	8,8±0,63	10,8±0,63	8,7±0,48	11,0±0,67
3	30	7,4±0,69	9,4±0,69	6,9±0,57	8,3±0,95	7,0±0,47	8,6±0,84
Подкожное заражение							
4	15	15,4±0,84	21,0±0,67	20,0±0,47	24,7±0,67	15,5±0,7	20,8±0,42
5	30	13,9±0,87	15,7±0,48	16,0±0,67	17,9±0,57	13,7±0,82	16,1±0,57

Примечание «-» — нет роста

При заражении беспородных белых мышей, культуру *M. avium* изолировали во всех подопытных группах, за исключением контрольной (табл 3) Установлено, что скорость роста культур (7-11 дней), выделенных из проб биоматериала от белых мышей, заражен-

ных внутривенно, достоверно ( $P < 0,001$ ) выше, чем из проб биоматериала от мышей, зараженных подкожно (14-25 дней)

После заражения белых мышей культурой *M. fortuitum* у всех исследуемых животных при вскрытии во внутренних органах изменений не обнаружили (табл 4)

**Таблица 4 - Рост культур *M. fortuitum* на различных питательных средах в зависимости от способа заражения белых мышей**

Группа	Сроки убоя, сутки	Питательные среды					
		Финп-2		«Новая»		«ИЭВСидВ»	
		Рост (сутки)					
		появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост
1 (контроль)	30	-	-	-	-	-	-
Внутривенное заражение							
2	15	11,9±0,57	15,4±0,84	13,7±0,82	15,7±0,48	10,2±0,63	11,8±0,78
3	30	10,2±0,63	15,8±0,78	11,7±0,48	13,9±0,87	10,0±0,47	11,9±0,57
Подкожное заражение							
4	15	-	-	-	-	-	-
5	30	10,8±0,63	16,8±0,42	20,0±0,47	24,8±0,42	16,9±0,57	24,7±0,67

Примечание «-» — нет роста

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при подкожном заражении белых мышей *M. fortuitum* нужно время, чтобы эти микобактерии были выделены из их организма (30 суток) При посеве проб биоматериала от белых мышей, инфицированных внутривенно, сроки убоя (15 и 30 дней) не влияют на скорость роста изолируемых культур микобактерий

В результате патологоанатомического вскрытия и осмотра внутренних органов белых мышей, инфицированных культурой *M. smegmatis* каких-либо видимых изменений не обнаружено

При введении белым мышам суспензии микобактерий *M. smegmatis* наблюдается полная элиминация культуры из организма Скорость роста культур микобактерий *M. smegmatis* на различных питательных средах из проб биоматериала от белых мышей, зараженных подкожно, достоверно ( $P < 0,001$ ) уступает скорости роста культур, выделенных от белых мышей, зараженных внутривенно(табл 5)

Таблица 5 - Рост культур *M. smegmatis* на различных питательных средах в зависимости от способа заражения белых мышей

Группа	Сроки убоя, сутки	Питательные среды					
		Финн-2		«Новая»		«ИЭВСиДВ»	
		Рост (сутки)					
		появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост
1 (контроль)	30	-	-	-	-	-	-
Внутривенное заражение							
2	15	2,2±0,42	4,2±0,42	2,1±0,31	3,8±0,42	2,0±0,47	3,9±0,57
3	30	-	-	-	-	-	-
Подкожное заражение							
4	15	7,9±0,32	11,9±0,32	7,8±0,42	12,0±0,47	8,1±0,32	12,2±0,42
5	30	-	-	-	-	-	-

Примечание «-» — нет роста

После внутривенного инфицирования белых мышей штаммами *M. bovis* одновременно с *M. fortuitum*, у них отмечали значительное увеличение печени, почек и селезенки. После подкожного заражения у мышей наблюдали незначительное увеличение печени и селезенки.

При посеве проб биоматериала от белых мышей, инфицированных внутривенно, отмечали более активный рост культур микобактерий на питательных средах, в сравнении с подкожным заражением. Следует обратить внимание на то, что при обработке биоматериала мышей, зараженных подкожно *M. bovis* (шт 14) одновременно с *M. fortuitum*, скорость роста культур достоверно ( $P < 0,001$ ) выше, чем при посеве суспензии биоматериала мышей, зараженных подкожно чистой культурой *M. bovis* (шт 14). Интенсивность роста культур микобактерий, изолируемых из проб биоматериала от белых мышей, зараженных сочетанием культур *M. bovis* и *M. fortuitum*, значительно выше, чем из биоматериала от мышей, зараженных *M. bovis*. Исходя из полученных данных, можно предположить, что *M. fortuitum* способствует усилению ростовых свойств микобактерий бычьего типа. Из таблицы 6 видно, что сроки появления видимых культур, исследуемых микобактерий, не зависят от сроков убоя белых мышей (15 и 30 суток).

После внутривенного заражения белых мышей штаммами *M. bovis* одновременно с *M. smegmatis* у мышей отмечали резкое увеличение печени, почек, селезенки. У животных, зараженных подкожно, отметили незначительное увеличение селезенки.

**Таблица 6 - Рост культур *M. bovis* в сочетании с *M. fortuitum* на различных питательных средах в зависимости от способа заражения белых мышей**

Группа	Сроки убоя, сутки	Питательная среда					
		Финн-2		«Новая»		«ИЭВСидВ»	
		Рост, сутки					
		появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост
1 (контроль)	30	-	-	-	-	-	-

Внутривенное заражение

2	15	10,2±0,63	12,1±0,57	10,9±0,87	12,9±0,31	9,0±0,47	10,8±0,79
3	30	10,0±0,47	11,7±0,48	10,8±0,42	12,8±0,42	9,4±0,69	10,8±0,63

Подкожное заражение

4	15	10,2±0,63	11,8±0,42	10,2±0,63	11,9±0,57	10,1±0,57	11,8±0,42
5	30	10,8±0,63	15,3±0,95	11,0±0,67	15,4±1,07	11,0±0,67	15,5±0,7

Примечание «-» — нет роста

**Таблица 7 - Рост культур *M. bovis* в сочетании с *M. smegmatis* на различных питательных средах в зависимости от способа заражения белых мышей**

Группа	Сроки убоя, сутки	Питательная среда					
		Финн-2		«Новая»		«ИЭВСидВ»	
		Рост, сутки					
		появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост
1 (контроль)	30	-	-	-	-	-	-

Внутривенное заражение

2	15	10,9±0,87	14,9±0,31	12,8±0,42	14,8±0,42	11,2±1,33	15,4±0,84
		5					
3	30	10,8±0,63	15,2±0,42	12,9±0,31	15,7±0,48	10,9±0,85	15,1±0,57

Подкожное заражение

4	15	17,9±0,57	24,1±0,31	17,8±0,42	24,2±0,42	15,0±0,67	20,0±0,47
5	30	20,1±0,32	26,2±0,63	20,3±0,67	20,5±0,85	15,0±0,47	20,8±0,42

Примечание «-» — нет роста

Данные таблицы 7 свидетельствуют о том, что существует достоверная ( $P<0,001$ ) зависимость скорости роста выделенных культур, от способа заражения белых мышей

После инфицирования белых мышей штаммами *M avium* одновременно с *M fortuitum* у животных, зараженных внутривенно, отмечали увеличение печени и селезенки, у мышей, зараженных подкожно, изменений во внутренних органах не наблюдали

Таким образом, мы установили (табл 8), что от способа заражения белых мышей достоверно ( $P<0,001$ ) зависят сроки роста культур *M avium* одновременно с *M fortuitum*. Сроки убоя (15 и 30 дней) белых мышей не влияют на скорость появления видимых колоний исходных культур

**Таблица 8 - Рост культур *M. avium* в сочетании с *M. fortuitum* на различных питательных средах в зависимости от способа заражения белых мышей**

Группа	Сроки убоя, сутки	Питательные среды					
		Финн-2		«Новая»		«ИЭВСиДВ»	
		Рост (сутки)					
		появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост
1 (контроль)	30	-	-	-	-	-	-
Внутривенное заражение							
2	15	7,4±0,69	8,6±0,84	6,9±0,54	9,4±0,69	6,1±0,32	7,9±0,32
3	30	6,3±0,67	8,1±0,31	6,4±0,69	7,9±0,32	5,9±0,57	7,8±0,42
Подкожное заражение							
4	15	15,4±1,07	20,3±0,67	13,9±0,87	19,4±0,69	15,5±0,7	20,0±0,47
5	30	15,4±1,07	20,1±0,32	15,3±0,95	20,5±0,85	15,7±0,48	20,3±0,67

Примечание «-» — нет роста

После заражения белых мышей штаммами *M avium* одновременно с *M smegmatis*, у экспериментальных животных, зараженных внутривенно, наблюдали незначительное увеличение печени, селезенки, у мышей, зараженных подкожно, изменений во внутренних органах не обнаружили (табл 9)

Исследования показали наличие двух исходных культур, выделенных из биоматериала от белых мышей у второй и четвертой группы. У третьей группы обнаружили только *M avium*, что подтверждает

**Таблица 9 - Рост культур *M. avium* в сочетании с *M. smegmatis* на различных питательных средах в зависимости от способа заражения белых мышей**

Группа	Сроки убоя, сутки	Питательные среды					
		Финн-2		«Новая»		«ИЭВСиДВ»	
		Рост (сутки)					
		появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост	появление	интенсивный рост
1	30	-	-	-	-	-	-
Внутривенное заражение							
2	15	10,8±0,63	15,3±0,95	11,0±0,67	15,4±1,07	11,0±0,67	15,5±0,7
3	30	10,0±0,47	13,9±0,87	10,2±0,63	13,7±0,82	10,2±0,63	13,9±0,87
Подкожное заражение							
4	15	15,8±0,63	20,0±0,32	14,9±0,32	20,1±0,32	15,1±0,57	20,3±0,67
5	30	-	-	-	-	-	-

Примечание «-» — нет роста

элиминацию *M. smegmatis* из организма белых мышей. Следует отметить, что заражение белых мышей одновременно *M. avium* и *M. fortuitum*, позволяет изолировать исходные культуры из проб биоматериала в более короткие сроки, чем при инфицировании животных культурами *M. avium* и *M. smegmatis* ( $P < 0,001$ )

В дальнейшем провели сравнительную оценку использования белых мышей в качестве лабораторной модели с целью изоляции микобактерий туберкулеза из проб биоматериала от крупного рогатого скота, реагирующего на ППД-туберкулин для млекопитающих, с общепринятым методом. Всего исследовали 43 пробы биоматериала от крупного рогатого скота, реагирующего на ППД-туберкулин для млекопитающих, параллельно двумя методами. общепринятым, согласно «Наставлению по диагностике туберкулеза животных» (2002), и предлагаемым. Суспензию, полученную в результате обработки проб биоматериала методом с использованием принципа седиментации, разделили на две равные части. Одной частью суспензии одновременно заражали морских свинок (по 3 головы) и проводили посев на питательную среду Финн-2 (общепринятый метод). Другой частью суспензии биоматериала, в количестве 0,5 мл, заражали беспородных белых мышей (по 6 голов) внутривенно в подхвостовую вену. Бакте-

риологические исследования проб биоматериала от мышей проводили через 15 и 30 дней после заражения (предлагаемый метод) Полученные культуры идентифицировали согласно «Наставлению по диагностике туберкулеза животных» (2002)

При использовании общепринятого метода изолировали 13 (30,2%) культур быстрорастущих микобактерий IY группы по Раньону Предлагаемым методом выделили 23 (53,5%) культуры микобактерий IY группы по Раньону, т е дополнительно – 10 (23,3%), также 5 (11,6%) культур микобактерий *M avium* и 3 (6,98%) культуры *M tuberculosis*

Таким образом, при бактериологических исследованиях 43 проб биоматериала с использованием беспородных белых мышей удалось выделить на питательных средах на 41,88% больше изолятов культур микобактерий различных видов, чем при использовании общепринятого метода исследований

Включение беспородных белых мышей в комплекс бактериологических исследований позволяет повысить эффективность лабораторной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота

### ***2.2.2. Анализ эффективности различных методов обработки и хранения проб биоматериала перед посевом их на питательные среды***

Исследовали пробы биоматериала от кроликов и белых мышей, зараженных *M bovis* (шт 14), от кур и белых мышей, зараженных *M avium* (шт 419) По принципу аналогов каждую пробу разделили на две равнозначные части Первую часть обрабатывали методом седиментации, вторую – по А П Аликаевой Также, в данном опыте, сравнивали эффективность различных химических веществ, используемых для обработки биоматериала 4, 5 и 6%-ные растворы гидроксида натрия, 4, 6, 8%-ные растворы щавелевой кислоты, 4, 6, 8%-ные растворы серной кислоты Посев полученной суспензии проводили на питательную среду Финн-2

Следует отметить, что выделение условно патогенной микрофлоры при обработке проб биоматериала методом Аликаевой составляет 10% - 30%, а методом седиментации 0 - 10% В эксперименте было установлено, что при обработке биоматериала гидроокисью натрия образуется вязкая суспензия, которая при отстаивании не расслаивается, а сливается сплошной массой В осадке оста-

ются грубые частицы. Рост культур из этой суспензии очень скудный на протяжении всего срока наблюдения. После обработки 6%-ной щавелевой кислотой, отмечали самый интенсивный рост культур микобактерий туберкулеза. Применение 6%-ной щавелевой кислоты для обработки биоматериала методом седиментации, позволяет получать культуры в более короткие сроки и предотвращает рост условно патогенной микрофлоры (рис.1).

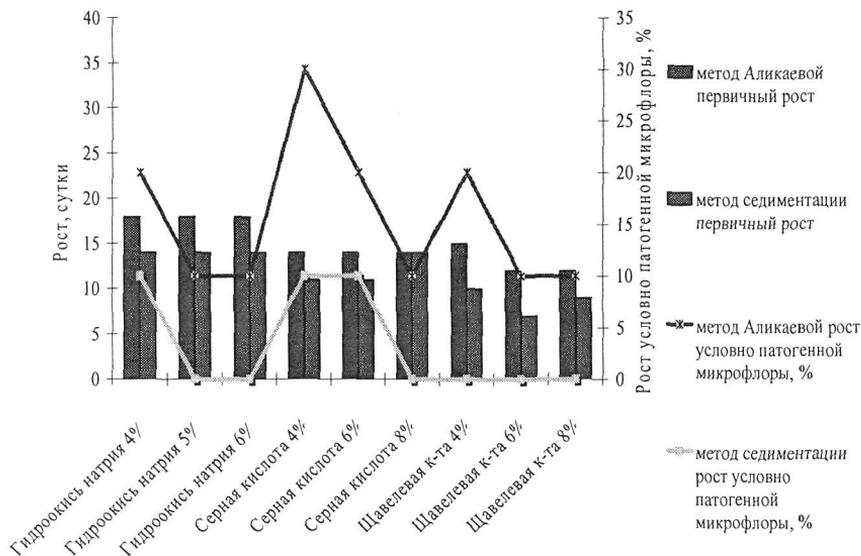


Рисунок 1 – Результаты обработки проб биоматериала от белых мышей, зараженных *M.bovis* шт.14, методами Аликаевой и седиментации с использованием различных химических веществ

При изучении влияния сроков хранения проб биоматериала от животных на изоляцию микобактерий туберкулеза исследовали пробы биоматериала от лабораторных животных: кроликов, зараженных *M. bovis* (шт.14), белых мышей, зараженных *M. bovis* (шт.14), кур, зараженных *M.avium* (шт.419), морских свинок, зараженных *M.tuberculosis* (шт. erdman); а также от крупного рогатого скота, реагирующего на ППД-туберкулин для млекопитающих. Пробы биоматериала хранили в морозильной камере ( $t = -18^{\circ}\text{C}$ ) в течение 3 месяцев. Посев суспензии проб биоматериала на питательные среды проводили в день их отбора, а затем через 1, 2 и 3 месяца после хранения (рис. 2).

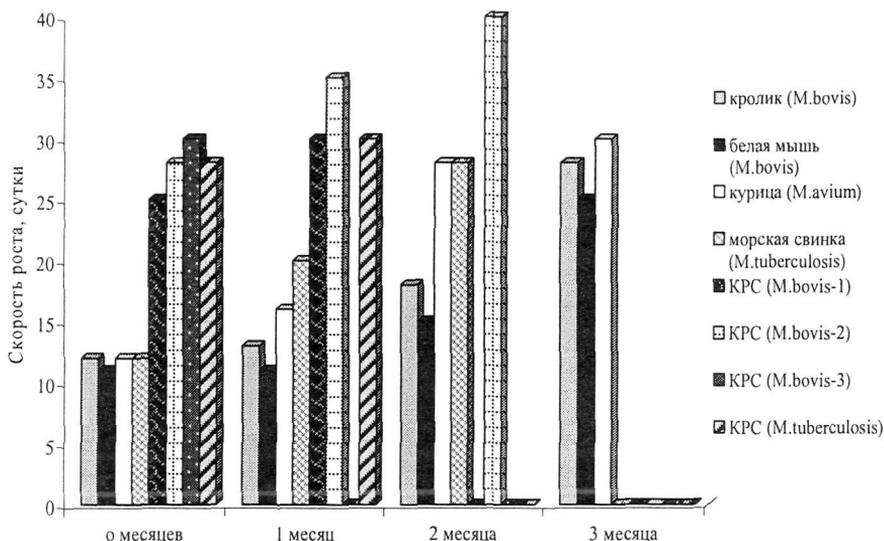


Рисунок 2 – Влияние сроков хранения проб биоматериала от животных на изоляцию микобактерий туберкулеза

При посеве суспензии из проб свежего биоматериала от животных рост культур на всех средах получен в 100% случаев. При исследовании проб биоматериала, хранившихся в течение одного месяца при  $t = -18^{\circ}\text{C}$ , культуры изолированы в 87,5%. По истечении двух месяцев хранения высеваемость культур составила 62,5%. Спустя три месяца хранения материала в тех же условиях всего выделено 37,5% культур.

Установлено, что хранение при  $-18^{\circ}\text{C}$  проб биоматериала от крупного рогатого скота в течение одного месяца и более, с момента их взятия до посева на питательные среды, приводит к уменьшению числа изолируемых культур микобактерий. Изолировать микобактерии туберкулеза из проб биоматериала от лабораторных животных возможно в 100% случаях в течение двух месяцев хранения в тех же условиях.

### 2.2.3. Разработка компьютерной базы данных для обработки полученных результатов

В процессе изучения культур микобактерий и в связи с постоянным увеличением числа получаемых данных о них возникла необходимость создания единой базы данных. База данных «Электронный журнал учета культур» предназначена для автоматизации

учета результатов выделения культур микобактерий, их видовой идентификации, других биологических характеристик микроорганизмов с возможностью создания итогового отчета, автоматизацией контроля сроков пересевов База данных позволяет проводить самостоятельный учет и обработку получаемых данных Кроме того, в результате автоматического цветового выделения культур с различными сроками пересевов, облегчается процесс организации пересевов культур и отдельных штаммов

База данных представляет собой совокупность базовых таблиц, форм, запросов и отчетов Вид и версия системы управления базой данных Microsoft Office Access 2003

Разработанная база данных «Электронный журнал учета культур» предназначена для использования в государственных диагностических и научно-исследовательских лабораториях различного уровня

### 3. ВЫВОДЫ

1 Использование беспородных белых мышей в комплексе бактериологических исследований при туберкулезе крупного рогатого скота повышает их эффективность Оптимальной дозой для инфицирования беспородных белых мышей микобактериями туберкулеза является 0,5 мл суспензии культуры, разведенной по стандарту мутности  $10^5$  ME После внутривенного инфицирования белых мышей (в подхвостовую вену) микобактериями туберкулеза изолированы исходные культуры в более ранние сроки (1,6–2 раза), чем после подкожного заражения экспериментальных животных

2 При подкожном инфицировании белых мышей *M fortuitum*, исходная культура изолирована из биоматериала мышей через 30 суток *M smegmatis* через этот промежуток времени элиминируется из организма животных Поэтому бактериологическое исследование биоматериала от мышей на предмет изоляции указанных микобактерий следует проводить спустя 30 и 15 дней после их инфицирования

3 При исследовании 43 проб биоматериала крупного рогатого скота, положительно реагирующего на ППД-туберкулин для млекопитающих, с использованием беспородных белых мышей в качестве лабораторной модели для изоляции микобактерий туберкулеза, получено 23 (53,5%) культуры быстрорастущих микобактерий IV группы по Раньону, 5 (11,6%) *M avium* и 3 (6,98%) *M tuberculosis*

4 Обработка биоматериала от лабораторных животных (белые мыши, кролики, куры, морские свинки) методом седиментации, в

сравнении с методом Аликаевой, при использовании 6%-ного раствора щавелевой кислоты, позволяет изолировать культуры микобактерий туберкулеза с более высокой скоростью роста (в среднем на 3-5 дней) при отсутствии условно патогенной микрофлоры. При изменении концентрации раствора щавелевой кислоты, использовании для обработки биоматериала серной кислоты и гидроокиси натрия снижаются показатели скорости и интенсивности роста культур на питательных средах, а также увеличивается вероятность роста условно патогенной микрофлоры (до 30%)

5 Изоляция культур микобактерий туберкулеза из биоматериала от животных резко снижается после хранения его при  $t^0 -18^0\text{C}$  в течение 3 месяцев (со 100% до 37,5%)

6 Для автоматизации учета результатов выделения культур микобактерий на питательных средах, их видовой идентификации и изучения других биологических характеристик разработан «Электронный журнал учета культур»

#### **4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

Результаты исследований, отраженные в методических рекомендациях «Изоляция и индикация микобактерий туберкулеза из биоматериала животных», рассмотренных и утвержденных подсекцией «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины СО Россельхозакадемии (протокол № 4, 2007), целесообразно широко внедрить в практику диагностических лабораторий и использовать в высших учебных заведениях

Данные об изоляции и индикации микобактерий туберкулеза из биоматериала животных используются в учебном процессе при изучении курса эпизоотологии в Институте ветеринарной медицины ФГОУ ВПО НГАУ

Разработанную базу данных «Электронный журнал учета культур» (свидетельство об официальной регистрации № 2007 620301, 2007 г Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам) целесообразно внедрить в работу государственных диагностических и научно-исследовательских лабораторий различного уровня

## 5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1 Питательные среды для культивирования микобактерий туберкулеза // Тр II Междунар науч - практ конф мол ученых Научные направления развития аграрной науки в работах молодых ученых РАСХН Сиб отд-ние , Новосибирск, 2006 – С 429-433

2 Сравнительная характеристика питательных сред для культивирования микобактерий туберкулеза // Тр II Междунар науч - практ конф мол ученых Научные направления развития аграрной науки в работах молодых ученых РАСХН Сиб отд-ние , Новосибирск, 2006 – С 433-435

3 Усовершенствование лабораторной диагностики туберкулеза сельскохозяйственных животных // Материалы междунар науч - практич конф мол ученых Молодые ученые – аграрной науке – Омск, 2006 – С 122-126

4 Восприимчивость белых мышей к микобактериям бычьего и птичьего видов / Соавт В Н Донченко // Сибирский вестник с -х науки – 2007 -№5 - С 106-108

5 Заражение белых мышей микобактериями туберкулеза / Соавт В Н Донченко // ВЕСТНИК КрасГАУ, выпуск 5, Красноярск, 2007 – С 132-133.

---

Подписано в печать 03 04 2008 г Формат 60×84 1/16  
Печ л 1,0 Тираж 100 экз Заказ № 90

---

ИПФ «Агрос»  
630501, Новосибирская область, пос Краснообск