

тер. Междунар. науч. конф. / Казанская государственная академия ветеринарной медицины. – Казань, 2000. – 146 с.

3. Веремей Э.И., Олехнович И.В. Этиология отитов у мелких животных. Актуальные проблемы ветеринарной хирургии: матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию кафедры хирургии. – Воронеж: Истоки, 1999. – С. 54-55.

4. Кашин А.В. Болезни органов чувств у животных и оказание им помощи // Животноводство. – 1994. – № 5. – С. 24-25.

5. Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E. Skin immune system and allergic skin diseases. In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 6th edn. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 2001: 574-601.

6. Angus J.C., Lichtensteiger C., Campbell K.L., Schaeffer D.J. Breed variations in histopathologic features of chronic severe otitis externa in dogs: 80 cases (1995-2001) // J. Am. Vet. Med. Assoc. – 2002. – Vol. 221 (7). – P. 1000-1006.

7. Rosser E.J. Causes of otitis externa // Veterinay Clinics of North America: Small Animal Practice. – 2004. – Vol. 34. – P. 459-468.

References

1. Belov A.D., Danilov E.P., Dupur I.I. Bolezni sobak. – M.: Agropromizdat, 1999. – 368 s.

2. Belov M.V., Stekol'nikov A.A. Operativno konservativnyy metod lecheniya otitov u sobak. Nezaraznye bolezni zhivotnykh: Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii. Kazanskaya gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny. – Kazan', 2000. – 146 s.

3. Veremey E.I., Olekhovich I.V. Etiologiya otitov u melkikh zhivotnykh. Aktual'nye problemy veterinarnoy khirurgii: Materialy mezhdunarodnoy nauchno prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 70-letiyu kafedry khirurgii. – Voronezh: Istoki, 1999. – S. 54-55.

4. Kashin A.B. Bolezni organov chuvstv u zhivotnykh i okazanie im pomoshchi // Zhivotnovodstvo. – 1994. – № 5. – S. 24-25.

5. Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E. Skin immune system and allergic skin diseases. In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 6th edn. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 2001: 574-601.

6. Angus J.C., Lichtensteiger C., Campbell K.L., Schaeffer D.J. Breed variations in histopathologic features of chronic severe otitis externa in dogs: 80 cases (1995-2001) // J. Am. Vet. Med. Assoc. – 2002. – Vol. 221 (7). – P. 1000-1006.

7. Rosser E.J. Causes of otitis externa // Veterinay Clinics of North America: Small Animal Practice. – 2004. – Vol. 34. – P. 459-468.



УДК 579.62:576.852.1:631.22

Е.А. Лискова, К.Н. Слинина
Ye.A. Liskova, K.N. Slinina

НОВЫЙ ПОДХОД К ВЫДЕЛЕНИЮ МИКОБАКТЕРИЙ, НОКАРДИОФОРМНЫХ АКТИНОМИЦЕТОВ И КОРИНЕБАКТЕРИЙ

A NEW APPROACH TO ISOLATION OF MYCOBACTERIA, NOCARDIA-SHAPED ACTINOMYCETES AND CORYNEBACTERIA

Ключевые слова: микобактерии, нокардиоформные актиномицеты, коринебактерии, деконтаминация, объекты животноводческих помещений, метод Гона-Левенштейна-Сумиоши, дезинфицирующее средство «Септустин».

Исследования объектов внешней среды на наличие в них микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий важны для выяснения источника сенсбилизации сельскохозяйственных животных, обуславливающей положительные аллергические реакции на ППД-туберкулин. Большое значение имеет контроль над циркуляцией возбудителя туберкулёза во внешней среде, который необходим в животноводческих хозяйствах как при диагностических ис-

следованиях на туберкулёз, так и при оценке результатов дезинфекции на дворах, фермах и комплексах, неблагополучных по туберкулёзу. Предложен новый метод выделения микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий из объектов животноводческих помещений, основанный на предпосевной обработке смывов с поверхностей помещений дезинфицирующим средством «Септустин» в оптимальной концентрации: предпосевная обработка проб смывов водным раствором септустина 1%-ной концентрации обеспечивает выделение культур микобактерий, а предпосевная обработка проб смывов водным раствором септустина 0,1%-ной концентрации – выделение нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий.

Keywords: *mycobacteria, nocardia-shaped actinomycetes, corynebacteria, decontamination, live-stock facility objects, Lowenstein-Sumiyoshi method, Septustin disinfectant.*

The studies of environmental objects for the presence of mycobacteria, nocardia-shaped actinomycetes and corynebacteria are important to identify the source of sensitization of farm animals causing positive allergic reactions to PPD-tuberculin for mammals. The control over the circulation of tuberculosis pathogen is important both for diagnostic studies on tuberculosis and evaluation of disinfection

results in animal husbandry facilities with unfavorable tuberculosis background. We proposed a new method for isolation of mycobacteria, nocardia-shaped actinomycetes and corynebacteria from live-stock facility objects based on pre-sowing treatment of samples from surfaces of buildings using Septustin disinfectant in optimum concentrations. Pre-treatment of the samples with an aqueous solution of Septustin in 1% concentration provides the isolation of cultures of mycobacteria, and pre-treatment of the samples with an aqueous solution of Septustin in concentration of 0.1% – the isolation of nocardia-shaped actinomycetes and corynebacteria.

Лискова Елена Афанасьевна, к.в.н, вед. н.с., Научно-исследовательский ветеринарный институт Нечернозёмной зоны Российской Федерации (ФГБНУ НИВИ НЗ России), г. Нижний Новгород. Тел.: (831) 434-56-36. E-mail: tuber50@mail.ru.

Слинина Клавдия Николаевна, д.в.н., гл. н.с., Научно-исследовательский ветеринарный институт Нечернозёмной зоны Российской Федерации (ФГБНУ НИВИ НЗ России), г. Нижний Новгород. Тел.: (831) 434-56-36. E-mail: tuber50@mail.ru.

Liskova Yelena Afanasyevna, Cand. Vet. Sci., Leading Staff Scientist, Research Veterinary Institute of Non-Chernozem Zone of the Russian Federation, Nizhniy Novgorod. Ph.: (831) 434-56-36. E-mail: tuber50@mail.ru.

Slinina Klavdiya Nikolayevna, Dr. Vet. Sci., Chief Staff Scientist, Research Veterinary Institute of Non-Chernozem Zone of the Russian Federation, Nizhniy Novgorod. Ph.: (831) 434-56-36. E-mail: tuber50@mail.ru.

Ввиду несовершенства бактериологических методов исследования выделение микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий из объектов внешней среды сопряжено со значительными методическими трудностями. Пробы с объектов животноводческих помещений имеют высокую степень общей загрязненности механическими примесями и банальной микрофлорой, рост которой на богатых питательных средах затрудняет выделение данных микроорганизмов. Для подавления сопутствующей микрофлоры осуществляется предпосевная обработка биоматериала, основанная на устойчивости микобактерий к растворам кислот и щелочей [1, 2].

В настоящее время для предпосевной обработки проб с объектов внешней среды в практике микробиологических лабораторий используют метод Гона-Левенштейна-Сумиоши (растворы серной кислоты) или комплексный метод обработки серной кислотой и едким натром. Существующие методы крайне жёстки, при этом уничтожаются слабокислотоустойчивые микобактерии, нокардиоформные актиномицеты и коринебактерии, а также частично снижается жизнеспособность патогенных микобактерий, что в конечном итоге снижает качество и эффективность бактериологической диагностики [3-6]. Это обуславливает необходимость разработки методов выделения микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий из объектов животноводческих помещений.

Цель исследований – разработать метод выделения микобактерий, нокардиоформных

актиномицетов и коринебактерий из объектов животноводческих помещений.

Материалы и методы

Разработка метода выделения микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий из объектов животноводческих помещений проведена в лаборатории инфекционных и инвазионных болезней сельскохозяйственных животных ФГБНУ «НИВИ НЗ России».

В работе использовали дезинфицирующее средство «Септустин» (изготовитель ООО «Уралстинол Био», Россия), обладающее широким спектром действия в отношении возбудителей инфекционных болезней бактериальной (включая туберкулёз), вирусной и грибковой этиологии [7].

Выделение микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий из объектов животноводческих помещений осуществлялось на основе предпосевной обработки септустином смывов с поверхностей объектов животноводческих помещений из хозяйств Нижегородской области.

Объектами исследования являлись поверхности стен, труб, поилок, кормушек, пола, навозных проходов. С поверхностей (1 м²) исследуемых объектов стерильным ватно-марлевым тампоном, увлажненным физиологическим раствором, отбирали по 5 проб-смывов, которые объединяли в одну пробу. Объединенная проба делилась на 3 части (образцов) по 5 мл суспензии. Первый образец подвергался деконтаминации традиционным методом Гона-Левенштейна-Сумиоши, второй – 0,1%-ным раствором септустина, третий – 1%-ным раствором септустина.

После обработки проводили посевы на среды Левенштейна-Йенсена и Финн-2 по 10 пробирок для каждой концентрации. Посевы инкубировали в термостате при 37⁰С и просматривали в течение 90 дней на наличие роста колоний микобактерий.

На протяжении всего периода исследования по мере появления колоний готовили мазки с последующей окраской по Грамму и Цилю-Нильсену. Идентификацию выделенных культур проводили методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на приборе Хромос GX 1000 [8].

В ходе исследования учитывали сроки появления роста, количество выделенных культур микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследований смывов с поверхностей объектов животноводческого помещения (стен, труб, кормушек, поилок, пола, навозных проходов) при разных методах предпосевной обработки представлены в таблице.

Данные таблицы свидетельствуют о наличии роста белых колоний без поверхностного мицелия на вторые сутки в посевах из проб смывов со стен и труб при деконтаминации материала 0,1%-ным раствором септустина. В мазках, окрашенных по Цилю-Нильсену, выявлялись неокислостойчивые палочки, овальные с тёмно-вишнёвыми или тёмно-синими многочисленными гранулами (зёрнами волютинина) внутри клетки. При окраске по Романовскому-Гимза вокруг клеток обнаруживалась розовая капсула. По отсутствию кислотоустойчивости и морфологическим признакам клетки культура отнесена к роду *Corynebacterium*, что подтвердилось исследованием жирнокислотного спектра клеток методом газожидкостной хроматографии

(отсутствие эфиров жирных кислот туберкулостеариновой кислоты, высших жирных кислот с числом атомов больше 20, значительное содержание олеиновой кислоты (C_{18:1}), составляющая приблизительно 47-60% от массы кислот).

В посевах из смывов с кормушек при предпосевной обработке материала растворами септустина 0,1%-ной концентрации отмечен рост на 2-е сут. беловато-жёлтых колоний в виде крупных слизистых без поверхностного мицелия. В мазках при окраске по Цилю-Нильсену обнаруживались неокислостойчивые микроорганизмы, полиморфные клетки – палочки и кокки, которые по результатам идентификации отнесены к роду *Rhodococcus*, что в последующем подтверждено хроматографическими исследованиями. На хроматограммах отмечены наличие туберкулостеариновой кислоты, выраженный пик пальмитолеиновой кислоты C_{16:1}, низкомолекулярные эфиры жирных кислот с числом углеродных атомов от 12 до 20 и отсутствие высокомолекулярных миколовых кислот, характерных для микобактерий.

При деконтаминации смывов с труб 1%-ным раствором септустина на 8-е сут. выросли слизистые блестящие колонии жёлтого цвета. По результатам окраски по Цилю-Нильсену и по морфологическим признакам их идентифицировали как микобактерии, что подтверждено исследованием жирно-кислотного спектра клеток методом газожидкостной хроматографии. По хемотаксономическим характеристикам (четко выражены пики кислот с 17 и 19 атомами углерода и ненасыщенных жирных кислот с числом атомов углерода больше 20, преобладала бегеновая кислота C_{22:0}, пик C_{26:0} отсутствовал), микобактерии идентифицировали как *M. vaccae*.

Таблица

Видовой состав и скорость роста микроорганизмов в посевах из смывов с объектов животноводческих помещений в зависимости от метода предпосевной обработки материала

Объекты животноводческих помещений	Метод обработки					
	метод Гона-Левенштейна-Сумиоши		р-р септустина			
	скорость роста, дн.	культура	0,1%	1%		
			скорость роста, дн.	культура	скорость роста, дн.	культура
Стена	12	<i>M. gordonae</i>	2	<i>Corynebacterium</i>	10	<i>M. gordonae</i>
Труба	12	<i>M. gordonae</i>	2	<i>Corynebacterium</i>	8 12	<i>M. vaccae</i> <i>M. gordonae</i>
Пол		–		–	10	<i>M. scrofulaceum</i>
Навозный проход		–		–	10	<i>M. scrofulaceum</i>
Кормушка	13	<i>M. gordonae</i>	2	<i>Rhodococcus</i>	10	<i>M. gordonae</i>
Поилки	14	<i>M. avium</i>	10	<i>M. avium</i>	12	<i>M. avium</i>

При предпосевной обработке 1%-ным раствором септустина из смывов со стен и кормушек на 10-е сут., а по методу Гона-Левенштейна-Сумиоши в посевах из смывов со стен на 12-й день и с кормушек на 13-е сут. появились колонии жёлтого цвета. При окраске мазков по Циллю-Нильсену обнаружались тонкие палочки бледно-розового цвета, которые идентифицировали как *M. gordonae*. На хроматограммах отмечено отсутствие туберкулостеариновой кислоты (C_{19} разв.), пик C_{14} и C_{14} разв. – двойной, полностью не разветвлённый.

Культуру *M. gordonae* выделили также в посевах из смывов с труб на 12-й день при деконтаминации материала традиционным методом и 1%-ным раствором септустина.

В посевах из смывов с поилок на 10-е сут. при предпосевной обработке образцов 0,1%-ным раствором септустина, на 12-е сут. при деконтаминации материала 1%-ным растворами септустина и на 14-е сут. традиционным методом появились колонии с бледно-жёлтым пигментом. В мазках при окраске по Циллю-Нильсену были обнаружены мелкие тонкие кислотоустойчивые палочки и кокки. На хроматограммах пики $C_{26:0}$ отсутствуют, высота пика $C_{24:0}$ значительно выше $C_{22:0}$, пик $C_{19:0}$ в значительном количестве, микобактерию идентифицировали как *M. avium*.

Кроме того, в посевах из образцов с пола и труб при обработке 1%-ным раствором септустина на 10-й день появились жёлтые блестящие колонии. В мазках, окрашенных по Циллю-Нильсену, обнаруживались тонкие палочки бледно-розового цвета. Культура идентифицирована методом газожидкостной хроматографии как *M. scrofulacium* (наличие высших миколовых кислот с числом углеродных атомов больше 20, пик $C_{24:0}$ больше $C_{22:0}$, пик $C_{26:0}$ отсутствует).

Закключение

Разработан метод выделения микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий из объектов животноводческих помещений, основанный на предпосевной обработке смывов с поверхностей объектов дезинфицирующим средством «Септустин» в оптимальной концентрации и соответствующей экспозиции: предпосевная обработка смывов водным раствором септустина 1%-ной концентрации обеспечивает выделение микобактерий, а предпосевная обработка смывов водным раствором септустина 0,1%-ной концентрации – выделение нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий.

Разработанный метод легко воспроизводим, позволяет в 2 раза повысить выделение микобактерий и ускорить их рост на

14,3-23%, обеспечивает 100%-ный рост нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий по сравнению с традиционным методом Гона-Левенштейна-Сумиоши.

Библиографический список

1. Прокопьева Н.И. Сезонность проявления аллергических реакций на туберкулин // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2007. – № 1. – С. 36-47.
2. Толстенко Н.Г. Патогенные свойства некоторых видов микобактерий, выделенных от животных и объектов внешней среды: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. – М., 2006. – 27 с.
3. Методическое наставление по проведению исследований при микобактериозах животных. – 2012. – 85 с.
4. Наставление по диагностике туберкулёза животных. – 2002. – 63 с.
5. Нестеренко О.А., Квасников Е.И., Ногина Т.М. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии. – Киев, 1985. – 334 с.
6. Оттен Т.Ф., Васильев А.В. Микобактериоз: монография. – СПб., 2005. – 224 с.
7. Наставление по применению препарата «Септустин» для дезинфекции объектов ветеринарного надзора. Уралстинол // БИО. – 2002.
8. Газохроматографический метод идентификации микроорганизмов возбудителей болезней животных: метод. рекомендации. – Н. Новгород, 1993. – 40 с.

References

1. Prokop'eva N.I. Sezonnost' proyavleniya allergicheskikh reaktsiy na tuberkulin // Veterinariya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh. – 2007. – № 1. – S. 36-47.
2. Tolstenko N.G. Patogennye svoystva nekotorykh vidov mikobakteriy, vydelennykh ot zhivotnykh i ob"ektov vneshney sredy: avtoref. dis. ... kand. vet. nauk: 16.00.03 / Tolstenko Nina Gavrilovna. – M., 2006. – 27 s.
3. Metodicheskoe nastavlenie po provedeniyu issledovaniy pri mikobakteriozakh zhivotnykh. – M., 2012. – 85 s.
4. Nastavlenie po diagnostike tuberkuleza zhivotnykh. – M., 2002. – 63 s.
5. Nesterenko O.A., Kvasnikov E.I., Nogina T.M. Nokardiopodobnye i korinopodobnye bakterii. – Kiev, 1985. – 334 s.
6. Otten T.F., Vasil'ev A.V. Mikobakterioz: monografiya. – SPb., 2005. – 224 s.
7. Nastavlenie po primeneniyu preparata «Septustin» dlya dezinfektsii ob"ektov vetnadzora. OOO «Uralstinol-BIO». – 2002.
8. Gazokhromatograficheskiiy metod identifikatsii mikroorganizmov vozbuditeley bolezney zhivotnykh: metodicheskie rekomendatsii. – N. Novgorod, 1993. – 40 s.

