

Выводы. 1. На оздоровление хозяйств от туберкулёза уходят годы и большие материальные затраты. Поэтому необходимо организовать надёжную профилактику этой болезни.

2. Несмотря на огромное количество дезинфектантов, существующих в наше время, большинство из них не отвечает всем требованиям. И вопрос разработки эффективных, экономичных, экологически безупречных и более современных дезинфектантов остаётся актуальным.

Список литературы

1. Горбань, М. И. Дезинфекция, дезинсекция и дератизация. — К.: Урожай, 1976. — 150 с. 2. Поляков, А. А., Менш, А. Ф. Ветеринарно-санитарные мероприятия при туберкулёзе // Ветеринария. — 1983. — № 9. — 39 с. 3. Завгородний, А. И. Виды микобактерий, распространённость в хозяйствах Украины и их эпизоотологическое значение: Дис... доктор вет. наук. — Х., 1997. — 31 с. 4. Тюрин, В. А., Масова, Г. А. Выживаемость микобактерий в навозе, стоках и современные методы их обеззараживания // Ветеринарная патология. — М., 2004. — № 1 — 2 (9). — 193 с. 5. Бурганов, З. Б. Опыт ликвидации туберкулёза крупного рогатого скота // Ветеринария. — 1995. — № 11. — 54 с. 6. Дудницкий, И. А., Бричко, В. Ф., Беляев, И. Я. Дезинфекция на фермах, неблагополучных по бруцеллёзу и туберкулёзу // Ветеринария. — 1989. — № 6. — 56 с. 7. Закомырдин, А. А., Деканасидзе, Т. В. Аэрозольная дезинфекция помещений при туберкулёзе // Ветеринария. — 1990. — № 10. — С 20—22.

DISINFECTION ON THE TROUBLE CONCERNING TUBERCULOSIS FARMS

Tumanova M. A.

Kharkov State Zooveterinary Academy

The data about the survival of micobacteria on the objects of environment, the ways of disinfection in the system of veterinary-and-sanitary measures are presented in the article. Chemical method of disinfection as the most available and widely used for carrying out of disinfection in farms where the sickness rate of tuberculosis is high is discussed.

УДК 576.851.42:636.295(524)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БРУЦЕЛЛ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ОВЕЦ И КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Турсункулов Ш.Ж. ¹, Джаилбекова А.С. ¹, Сейдахметова Р.Д. ², Абдрахманов С.К. ³,
Турсункулов А.З. ², Турлыбеков С.А. ², Энгисева К.М. ¹, Сарманов А. ²

¹ ГУ «Национальный центр мониторинга, референции, лабораторной диагностики и методологии в ветеринарии» МСХ РК, г. Астана, Казахстан

² Алматинский филиал ГУ «Национальный центр мониторинга, референции, лабораторной диагностики и методологии в ветеринарии» МСХ РК, г. Алматы, Казахстан

³ Казахский государственный агротехнический университет им. С. Сейфуллина, г. Астана, Казахстан

Введение. Эпизоотическая обстановка по бруцеллезу в Республике Казахстан остаётся неблагополучной и определяется наличием бруцеллеза среди сельскохозяйственных животных - мелкого и крупного рогатого скота, являющихся основным источником возбудителя бруцеллеза для людей.

Выделение культуры возбудителя бруцеллеза является неоспоримым доказательством диагноза и характеризует активное состояние инфекции. Изоляция гемокультуры, особенно при инфекции типом Вг. abortus, не всегда даёт положительный результат. Отрицательный результат гемокультуры отнюдь не исключает наличия бруцеллеза [1]. Немало важный фактор при выделении культур это стадия развития болезни, бруцелл удастся высеять из крови больных хроническим бруцеллезом только при обострениях, протекающих с высокой температурой или в редких случаях в межрецидивный период, при клинической компенсации процесса[2].

Важно отметить, что в ветеринарной лабораторной практике весьма редко для бактериологической диагностики бруцеллеза используют цельную кровь животных. Этот метод выделения гемокультуры ввиду его сложности труднодоступен в обычной ветеринарной практике.

Получение положительных гемокультур ценно и в диагностическом, и в прогностическом аспектах. В то же время среди исследователей нет единого мнения по многим вопросам, возникающим в процессе проведения микробиологического исследования крови [3]. Исследования проводились на базе лаборатории вирусологии и микробиологии ГУ «НЦМР» г. Астана.

Цель данного исследования заключалась в определении таксономических видов и изучении биологических свойств культур бруцелл, изолированных из цельной крови животных, имевших положительные результаты на бруцеллез в РБП, РА, РСК.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись 750 образцов цельной крови от мелкого рогатого скота и 10 проб цельной крови от крупного рогатого скота.

Образцы крови отбирали из яремной вены животных в пробирки типа Vacutainer с EDTA (10.8 mg) с последующей транспортировкой в лабораторию при -20C° .

Все исследования с цельной кровью, обработанной антикоагулянтом и изолятами бруцелл проводились в шкафах биобезопасности (ШББ) II класса безопасности.

В процессе бактериологических исследований использовали агар для бруцелл (Brucella Agar Base M074), стерильную 5% лошадиную сыворотку (Horse Serum, Heat inactivated, Sterile-filtered), селективную среду для бруцелл, модифицированную (Brucella Selective Supplement, Modified FD 161), 4-х шаговый набор для окраски по Граму (BD Gram Stain Kit), поликлональный реактив для Brucella (BD 240934 polyclonal AMS производства Fisher – cat # 14-911-117), нейтральный акрифлавин фирмы Sigma (Sigma A-8126), пипетки Difco BD с реактивом каталазы- производства BD261203, пипетки Difco BD с реактивом оксидазы-производства BD 261181, сероводородные полоски (Lead acetate test paper), тионин, фуксин (Basis Fuchsin special for flagella), моноспецифические сыворотки antiabortus, antimelitensis). В качестве контролей использовали коллекционные эталонные штаммы бруцелл.

Оттаивание образцов крови для культивирования проводили в шкафу биобезопасности на впитывающей воду салфетке. После оттаивания образцы перемешивали вортексом. Каждый образец аккуратно открывали и 300 мкл брали стерильной пипеткой и вносили в центр питательной среды промаркированных чашек Петри. Стерильной петлей каплю штриховали по чашке как «газон». Каждая тестируемая проба крови высевалась в три чашки. После высушивания чашки помещали в герметизируемый пластиковый контейнер для помещения в термостат. Чашки инкубировали (в аэробных и анаэробных условиях) в термостатах для биологически опасных материалов, при температуре $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ не менее трех недель. При этом те колонии, которые появились ранее, чем через 3 дня, мы не относили к бруцеллам. Чашки проверяли на наличие колоний бруцелл каждые 2 – 3 дня. За весь период инкубации образцов цельной крови нами выделено 33 культуры микроорганизмов.

После того как в чашках Петри получали рост культур начали проводить исследования по их индикации и идентификации.

Идентификацию и дифференциацию видов и биотипов бруцелл проводили по методике и схеме ФАО/ВОЗ, утвержденной подкомитетом по таксономии бруцелл Международного комитета экспертов (1970).

При этом культуры микроорганизмов, изолированные из патологического материала пересеивали на косяк со скошенным агаром. Через 2-е суток выросшие культуры подвергались идентификации с помощью микроскопии окрашенных мазков по Граму и ориентировочной реакцией агглютинации на стекле с агглютинирующей сывороткой.

Для установления признаков диссоциации использовали постановку пробы с раствором триафлавина на предметном стекле и реакции термоагглютинации.

Для отбора культур бруцелл находящиеся только в S-форме использовался метод Уайт–Вилсона (окраска колоний кристаллвиолетом).

Для проведения дальнейшей дифференциации изучаемых культур изолятов бруцелл культуры в S -форме отсеивались в пробирки на косяк с агаром и инкубировались в термостате в течение 2-х суток.

После чего культуры бруцелл дифференцировали по редуцирующей активности их в отношении красок - основной фуксин и тионин в концентрации: фуксин 1: 50000; 1:25000, тионин 1: 50000.

Для контроля делали посеы испытуемых культур на агар, без наличия красок. Посевы помещали в термостат при 37° С. Учет результатов проводили через 3-е суток инкубации.

Учет роста культур на чашках Петри проводился в крестах, по следующей схеме: интенсивный рост по всему штриху - четыре креста (++++); интенсивный рост в начале и более слабый в конце штриха - три креста (+++); менее интенсивный в начале или слабый рост по всему штриху - два креста (++) ; очень слабый рост по ходу штриха или отдельные колонии - один крест (+).

Устойчивость к красителям основному фуксину и тионину использовали для идентификации видов бруцелл. Красители вводили в среду, поддерживающую рост бруцелл. Оптимальная концентрация красителя составляет 1:50000. *V. melitensis*, *V. suis*, *V. canis* и *V. ovis* растут в присутствии тионина. *V. abortus* и *V. neotomae* ингибируются тионином (рост отсутствует). *V. melitensis* и *V. abortus* растут в присутствии основного фуксина, другие виды *Brucella* ингибируются данным красителем.

Для дифференциации изучаемых культур бруцелл по интенсивности образования сероводорода использовались взвеси бруцелл в физиологическом растворе 10⁹ м.к./мл из испытуемых 2-х суточных агаровых культур, которые были высеяны в пробирки со скошенным агаром. После чего между внутренней стенкой пробирки и ватной пробкой помещали полоску фильтровальной бумаги, пропитанной насыщенным раствором уксусно - кислого свинца. Нижний конец бумаги был расположен над верхним краем посева, не касаясь питательной среды. Опытные образцы инкубировались в термостате при температуре 37°С. Результаты начинали учитывать через каждые 2-ое суток и на протяжении 6 суток.

Для установления характера роста бруцелл в бульоне нами использовались взвеси дифференцируемых штаммов бруцелл из 2-х суточных агаровых культур в физиологическом растворе с содержанием 10⁹ м.к./мл и засеивались в пробирки с бульоном.

Чувствительность испытуемых штаммов бруцелл к бруцеллезному бактериофагу определялась с помощью бактериофага Тб вида абортус. Для постановки пробы с фагом использовали 24-х - 43-х часовые агаровые культуры бруцелл, из которых готовили взвеси в физиологическом растворе с содержанием 10⁹ м.к./мл. Пипетками бактериальные взвеси по несколько капель наносились на агаровую поверхность чашек Петри. Засеянные чашки подсушивали при комнатной температуре или при 37° С. После чего каждую чашку делили на 2 сектора. На одну половину каждой чашки наносили каплю цельного фага, на другую половину фаг, разведенный физиологическим раствором 1:1. Все чашки с опытными штаммами бруцелл ставили в термостат на 24-46 часов.

Оценку результатов проводили следующим образом: сплошной лизис оценивали в четыре креста (++++), лизис с небольшим количеством колоний бруцелл - в три креста (+++), резко ослабленный рост - два креста (++) , слабый лизис - один крест (+) и отсутствие лизиса - отрицательный результат, знак минус (-).

Реакцию агглютинации с моноспецифическими сыворотками ставили в пробирках. На каждую изучаемую культуру брали по 4 пробирки для каждой сыворотки, т.е. по 8 пробирок. В пробирки наливали по 0,5 мл физиологического раствора. Моноспецифические сыворотки разводили 1:10 и в объеме 0,5 мл. вносили в первые пробирки каждого ряда и титровали, получая разведения 1:20; 1:40; 1:80; 1:160. Затем предварительно инактивированные в течение часа при 60° С 2-х суточные агаровые культуры изучаемых штаммов бруцелл с содержанием 10⁹ м.к./мл добавляли по 0,5 мл во все пробирки. Реакцию ставили с 2-мя контролями:

а) контроль с эталонным штаммом *B. melitensis*. 16-М; б) контроль с эталонным штаммом *B. abortus* 544. Пробирки со смесями сывороток и антигенов выдерживали в термостате при температуре 37° С 18-20 часов, а затем в течение 2-х часов при комнатной температуре. После этого проводили учет реакции. Реакцию считали положительной, начиная с разведения сывороток 1:40. Учет реакций проводился по 4-х балльной оценке.

Ферментативные свойства испытуемых изолятов бруцелл изучали на основе использования оксидазного, уреазного и каталазного тестов.

С помощью оксидазного теста обнаруживали присутствие фермента цитохром оксидазы. Оксидазный реагент содержит N,N,N',N'-тетраметил-р-фенилендиамин гидрохлорид. В присутствии цитохром оксидазы оксидазный реагент образует индофенол синий.

Уреазный тест использовался нами для определения способности бруцелл осуществлять гидролиз мочевины с помощью фермента уреазы. Образуются две единицы аммиака, что приводит к щелочности. Образование щелочи определяется индикатором рН. Мочевина Кристенсена содержит индикатор рН феноловый красный, который в кислой среде (рН 6,8) имеет желтый цвет. В щелочной среде (рН 8,4) индикатор меняет цвет среды на розовый.

Фермент каталаза катализирует гидролиз перекиси водорода на воду и кислород. Все виды бруцелл являются каталаза-положительными.

Результаты и обсуждение. При индикации бактерий на первом этапе исследований провели изучение культурально - морфологических свойств бактерий и постановку ориентировочной реакции агглютинации на стекле со специфической бруцеллезной сывороткой.

При просмотре снизу через чашку Петри с культурой отмечали, что изучаемые культуры микроорганизмов вегетировали в виде бледных полупрозрачных круглых колоний цвета меда с ровными краями, на пластинке скошенного агара они также представляли собой бесцветные колонии в виде холмиков (Рис 1).

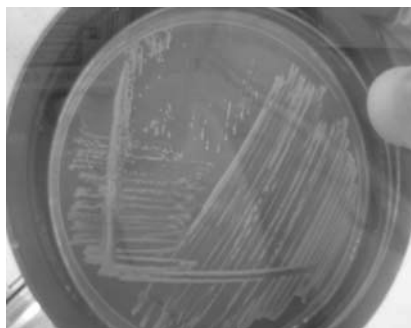


Рис. 1

Просмотр мазков окрашенных по Грамму, что тестируемые микроорганизмы являются грамтрицательными коккобациллами, окрашиваются в розовый цвет.

С целью установления рода изучаемых коккобацилл, мы провели постановку ориентировочной реакции агглютинации на предметном стекле со специфической бруцеллезной сывороткой. В капле специфической бруцеллезной сыворотки, отчетливо видна агглютинация частиц тестируемой культуры микроорганизма, выраженные хлопья образовались сразу на первой минуте проведения данного теста.

Результаты изучения культуральных свойств изолированных микроорганизмов (особенностей вегетации на питательных средах), их морфологии (микроскопия мазков), а также РА на стекле дали нам основание утверждать, что изучаемые изоляты микроорганизмов являются бруцеллами.

Выделенные изоляты показали по чувствительности каталаза и оксидаза-положительными.

Выявление наличия признаков диссоциации в культурах бруцелл проводили с помощью пробы с акрифлавином.

Гладкие колонии бруцелл (S- форма) остаются во взвеси, а шероховатые колонии сразу агглютинируют. Этот тест свидетельствует о том, что в культуральном материале присутствуют бруцеллы как в S- форме, так и диссоциированные клетки бруцелл. Для проведения дальнейшей типизации изолятов бруцелл, нам необходимы были только бруцеллы находящиеся в S- форме. Для достижения этой цели 2-х суточные колонии бруцелл в чашках Петри подвергли окраске по методу Уайт-Вилсона. По результатам окрашивания колоний бруцелл кристалвиолетом для дальнейшей дифференциации изолятов бруцелл нами были отобраны культуры в S- форме. Гладкие колонии выглядят белыми. Они не воспринимают эту краску, т.е. культуры находятся в S- форме. Диссоциированные колонии окрашены различными оттенками лилового цвета.

Чтобы окончательно убедиться в том, что нами для дальнейшей дифференциации из бактериального газона отобраны именно культуры бруцелл в S- форме мы провели постановку реакции термоагглютинации. Сохранение гомогенности суспензий бруцелл после прогрева в водяной бане при температуре 90°C в течение 30 минут подтвердило, что тестируемые культуры бруцелл не являются диссоциантами.

Определение видовой принадлежности бруцелл начали путем изучения редуцирующей активности в отношении красок – основного фуксина и тионина. При этом было установлено, что 32 штамма бруцелл относятся к виду *V.melitensis* и 1 штамм – к *V.abortus*.

Этот факт был подтвержден результатами изучения интенсивности образования сероводорода бруцеллами инкубируемыми на агаре.

Важно отметить, что все 32 штамма бруцелл, отнесенные нами по результатам предыдущего теста к *V.melitensis* почти не продуцировали H_2S .

Результаты изучения агглютинабельных свойств исследуемых культур бруцелл проводили с использованием моноспецифических сывороток – антиабортус и антимелитензис в пробирочной РА.

Изоляты бруцелл выделенные от мелкого рогатого скота (32 штамма), которые по предшествующим тестам были отнесены к виду *V.melitensis*, при постановке РА с использованием антимелитензисной сыворотки имели выраженную агглютинацию с полным просветлением жидкости, результаты реакции были оценены нами в три-четыре креста. Тогда как постановка реакции с антиабортусной сывороткой не вызвало явлений агглютинации в пробирках со взвесями этих же 32 штаммов бруцелл, содержимое этих пробирок представляло собой гомогенную взвесь без осадка. Полученные результаты подтвердили, что все 32 штамма бруцелл, выделенные от мелкого рогатого скота относятся к виду *V.melitensis*.

Результаты типирования культур бруцелл с помощью фагов. Результаты определения чувствительности к фагу штамма бруцелл, выделенного от крупного рогатого скота показал, что на бактериальном газоне этой культуры виден лизис разведенным фагом агаровых культур бруцелл. Нанесение же цельного и разведенного фага на агаровую поверхность чашек Петри со взвесями бруцелл, изолированных от мелкого рогатого скота не вызывало лизиса колоний.

Добавление к питательной среде стрептомицина вызывало полное угнетение роста обеих видов бруцелл. Тогда как к пеницилину культуры бруцелл как вида абортус, так и мелитензис показали различную степень чувствительности.

Полная характеристика биологических свойств изученных изолятов бруцелл представлена в таблице 1.

Выводы. В результате бактериологических исследований 760 проб цитрированной крови нами было выделено 33 культуры микроорганизмов. Родовая и видовая принадлежность бруцелл установлена нами на основе дифференциальных тестов рекомендованных ФАО/ВОЗ. Все 33 культуры были отнесены нами к роду *Brucella*, что составляет 4,3% от общего количества исследованных проб, из них 32 культуры выделенные от мелкого рогатого скота отнесены к *V.melitensis* и 1 культура, изолированная от крупного рогатого скота - к *V.abortus*.

Таблица 1 — Результаты дифференциации видов бруцелл, выделенных из цельной крови животных с серологичными показателями на бруцеллез

Наименование района	Количество изолятов бруцелл	Вид животного	Вакцинация	Наименование исследований											Вид бруцелл		
				Окраска мазков по Граму	РА на стекле	Форма S R	Акрифлавин	Сероводород	Реакция термотитрования	Оксидаза	Каталаза	Уреаза	Потребность CO ₂	Тионин		Фульсин	РА с Antibrucis
Алматинская область (29 штамма полевых изолятов бруцелл)																	
Алакольский район	18	MPC	Нет	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	Br. melitensis
Енбекшиказахский район	10	MPC	Нет	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Br. melitensis
Кербулакский район	1	KPC	Нет	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	Br. abortus
Жамбылская область (4 штамма полевых изолятов бруцелл)																	
Рыскуловский район	1	MPC	Нет	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Br. melitensis
Таласский район	1	MPC	Нет	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Br. melitensis
Байзаковский район	2	MPC	Нет	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Br. melitensis

Список литературы

1. Багирова Н. Диагностика бактерии. Микробиологическая диагностика. том4/1/2002 г. 2. Бисярин В.П. «Бруцеллез», Медицина, Москва, 1972г. 3. Беклемишев Н.Д. Хронический и латентный бруцеллез. Издательство «Наука», Алма-ата, 1965 г. 4. Скородумов Д.И., Субботин В.В., Сидоров М.А., Костенко Т.С., Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных, Москва, 2005г.

DETERMINATION OF SPECIFIC BELONGING OF BRUCELLA, ISOLATED FROM SHEEP AND CATTLE WHOLE BLOOD

Tursunkulov Sh.Zh. ¹, Dzhaibekova A.S. ¹, Seydahmetova R.D. ², Abdrahmanov S.K. ³, Tursunkulov A.Z. ², Turlybekov S.A. ², Engisheva K.M. ¹, Sarmanov A. ²

¹ National Center of Monitoring, Reference, Laboratory Diagnostics and Methodology in Veterinary Medicine, Astana, Kazakhstan

² Almaty Filial of the National Center of Monitoring, Reference, Laboratory Diagnostics and Methodology in Veterinary Medicine, Almaty, Kazakhstan

³ Kazakh State Agrotechnical University named after S. Seyfullin, Kazakhstan

Information concerning specific belonging of Brucella, isolated from sheep and cattle whole blood is presented in the paper.

УДК 616.981.42.:636.1

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ БРУЦЕЛЛЕЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ В КАЗАХСТАНЕ ЗА 2008 ГОД

Турсункулов Ш.Ж., Каиржанова А.Г., Даугалиева А.Т.

ГУ «Национальный центр мониторинга, референции, лабораторной диагностики и методологии в ветеринарии», г. Астана, Казахстан

Цель работы – оценка эпизоотической ситуации по бруцеллезу в Казахстане за 2008 год. Проведен анализ результатов серологических исследований материала от сельскохозяйственных животных в соответствии с отчетными данными. Показано что бруцеллез среди крупного и мелкого рогатого скота регистрируется во всех областях Казахстана. Положительные показатели среди КРС выше, чем среди МРС. Сравнительно реже бруцеллез регистрируется среди лошадей, верблюдов и свиней.

Для ветеринарной науки и практики важной проблемой является дальнейшее совершенствование системы ветеринарно-санитарных мероприятий, направленных на снижение потерь от заболеваемости бруцеллезом сельскохозяйственных животных. Ликвидация указанной болезни представляет собой одну из актуальных задач ветеринарии и здравоохранения, так как она причиняет значительный ущерб народному хозяйству и представляет угрозу здоровью населения [1].

Эпизоотический мониторинг является основой рационального планирования и осуществления мероприятий по борьбе с инфекционными болезнями и оценке их эффективности. Он позволяет выявить причины и проследить эпизоотические и социально-экономические последствия этих изменений, обеспечивает комплексную и быструю корректировку противоэпизоотических мероприятий и разработку периодических прогнозов [2].

Одним из основных составляющих эпизоотологического мониторинга инфекционных заболеваний, в том числе бруцеллеза, является диагностика, осуществление которой в настоящее время проводится в основном с помощью бактериологических и серологических методов исследования. При этом наиболее достоверным является бактериологический метод, так как обнаружение культуры бруцелл является неоспоримым доказательством наличия инфекции. Однако по частоте выявления возбудителя болезни, трудоемкости исполнения и затратам, этот метод значительно уступает серологическому [3].

Серологический метод является более доступным для проведения массовых исследований, достаточно чувствительным, специфичным. Успех проведения се-