

УДК 619:317-619:616.982.2

## УСКОРЕННАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА ЖИВОТНЫХ

Ощепков В.Г., Таллер Л.А., Секин Е.Ю., Вассимирская Т.А., Слепченко А.Д.

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных Сибирского отделения Российской академии сельскохозяйственных наук, г. Омск

Одним из определяющих методов бактериологической диагностики туберкулеза является культуральный, в основе которого лежит способность микобактерий размножаться на соответствующих питательных средах и образовывать микро- и макроколонию.

Наиболее часто для культивирования микобактерий используют плотные яичные питательные среды – Левенштейна–Йенсена, Гельберга, Финн–2. Однако эти среды на сегодняшний день не всегда отвечают требованиям практической лабораторной диагностики.

Патогенные микобактерии в большинстве являются биохимически слабоактивными, содержат сравнительно мало ферментов и ростовых веществ, о чем свидетельствует их медленный и скудный рост и потребность в многокомпонентных питательных средах. Кроме этого, в результате широкого применения антибиотиков, химиопрепаратов, различных дезинфектантов происходят глубокие изменения в жизнедеятельности и метаболизме микробных клеток, а микобактерии с ослабленной жизнеспособностью плохо растут или вообще не растут на питательных средах. В связи с этим усилия многих авторов направлены на повышение высеваемости микобактерий и сокращения сроков роста при выделении их из биоматериала. С этой целью испытываются различные химические и биологические препараты в качестве дополнительных компонентов селективных питательных сред. В последнее время большое внимание уделяется изучению в качестве стимуляторов роста добавок растительного происхождения [1, 2, 5, 6].

Наряду с усовершенствованием микробиологических методов обнаружения возбудителя идет поиск новых способов индикации и идентификации микобактерий. В лабораториях все чаще, наряду с микробиологическими методами применяют молекулярно-генетические, в частности полимеразную цепную реакцию, в основе которой лежит ферментативная амплификация выбранных специфических участков генома *M. tuberculosis*, *M. bovis*, их детекция и идентификация [3].

Достоверность результатов также во многом зависит от выбора объекта исследований. Например, большинство авторов отмечают, что при исследовании в ПЦР непосредственно биоматериала от больного туберкулезом крупного рогатого скота положительный результат наблюдается в 45,5 % случаев, в то время, как при исследовании выделенных культур положительные результаты получены в 95,4–100 % случаев [4].

Целью нашей работы было разработать оптимальный комбинированный метод лабораторной диагностики туберкулеза с применением модифицированных питательных сред в сочетании с полимеразной цепной реакцией (ПЦР).

Ранее нами были разработаны плотные питательные среды, содержащие фитопрепараты, которые обладают наиболее высокими диагностическими качествами по сравнению с общепринятыми (Левенштейна–Йенсена, Гельберга и др.) и повышают высеваемость микобактерий из различных биоматериалов на 21,4–30,0 %.

Для индикации микобактерий в ранние сроки культивирования (до появления видимого роста) нами дополнительно был использован метод полимеразной цепной реакции.

**Материалы и методы.** Работа проведена на базе лаборатории клеточной биотехнологии и лаборатории диагностических исследований ВНИИБТЖ.

В ходе разработки комбинированного метода была изучена диагностическая значимость 26 композиций (вариантов) питательных сред, в которые мы добавляли для стимуляции роста и размножения патогенных микобактерий экстракты из пяти видов растений. Лучшими оказались среды с фитодобавками из полыни и люцерны. В ПЦР было испытано три тест-системы, наиболее подходящей была признана тест-система «МТБ-КОМ» для выявления возбудителя туберкулеза *M. bovis* и *M. tuberculosis*, производства ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» г. Москва.

При производственной апробации разработанного метода для исследования был отобран биоматериал от крупного рогатого скота положительно реагировавшего на ППД-туберкулин для млекопитающих из хозяйств Омской области с различной эпизоотической ситуацией по туберкулезу.

После предварительной пробоподготовки суспензии биоматериала высевали на 3 варианта питательных сред, в том числе Левенштейна–Йенсена (контроль) и плотные питательные среды в нашей модификации (ФБС-1 и ФБС-2), культивировали при 37°C в течении 1–2 месяцев. Кроме этого, суспензиями были заражены морские свинки, для подтверждения наличия микробного агента в исследуемом биоматериале.

Наряду с общепринятыми методами для индикации и идентификации возбудителя использовали полимеразную цепную реакцию в ранние сроки его культивирования. Всего было исследовано 20 проб биоматериала от крупного рогатого скота, в том числе 12 проб – с туберкулезными поражениями и 8 – без визуально определяемых туберкулезных поражений. На 3 и 5 сутки культивирования посевов с поверхности питательных сред, на которых не было видно роста бактериальных культур, сделаны стерильным физиологическим раствором смывы (всего 120 «слепых» смывов) и исследованы методом ПЦР. Из каждого образца смывов были приготовлены также мазки, окрашены по Цилю – Нильсену и исследованы методом световой микроскопии с помощью визуализированной системы AxioStar plus с микрофотографированием фирмы Carl Zeiss, результаты обработаны в электронной программе Axiovision Rel 4.7.

В качестве положительного образца в опытах использовали суспензию культуры *M. bovis* шт. 14 в разведении 1:10<sup>6</sup>

**Результаты исследования.** Использование комбинированного культурально-генетического метода позволило существенно сократить сроки выявления патогенных микобактерий и повысить информативность диагностических исследований (таблица 1).

Так при исследовании 12 проб биоматериала с характерными для туберкулеза поражениями (легкие, печень, лимфоузлы) традиционным культуральным методом микобактерии туберкулеза были выделены на питательных средах только на 20–40 сутки из 8 проб (66,6 %), а атипичные микобактерии из 7 проб (58,4 %). Биологическим методом на морских свинках туберкулез подтвержден также как и культурально-генетическим методом в 100 % случаев, но после 40 суток.

В то же время положительная реакция в ПЦР отмечалась во всех смывах из 12 проб (100 %) на 3 и 5 сутки.

При исследовании 8 проб биоматериала без видимых туберкулезных поражений на 3 сутки положительная реакция в ПЦР отмечалась в смывах из одной пробы (12,5 %), отрицательная в смывах из 7 проб (87,5 %).

На 5 сутки положительный результат отмечали в смывах из 2 проб (25,0 %), а отрицательный – в смывах из 6 (75,0 %).

### Розділ 3. Ветеринарна мікробіологія

**Таблиця 1** – Результати сравнительного исследования биоматериала от крупного рогатого скота из неблагополучных по туберкулезу хозяйств комбинированным методом в ранние сроки культивирования в сопоставлении с традиционным бактериологическим методом

Характеристика исслед. материала	Кол-во исслед. проб биоматериала (животных)	Результаты полученные:															
		комбинированным методом (посевы + ПЦР)								традиционным бактериологическим методом							
		3 сутки				5 сутки				культуральное исследование 20–40 сутки			биологическая проба 40–60 сутки				
		Положит.*		Отрицат.		Положит.*		Отрицат.		Положит.*		Отрицат.	Положит.*		Отрицат.		
		Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%		
Биоматериал с характерными туберкулезными поражениями	12	12	100,0	–	–	12	100,0	–	–	8	66,6	–**	–	12	100,0	–	–
Биоматериал без характерных туберкулезных поражений	8	1	12,5	7	87,5	2	25,0	6	75,0	–	–	–**	–	–	–	8	100,0
Итого:	20	13	65,0	7	35,0	14	70,0	6	30,0	8	40,0	12	60,0	12	60,0	8	40,0
Культура M.bovis шт.14 (контроль)	1	1	100,0	–	–	1	100,0	–	–	1	100,0	–	–	1	100,0	–	–

**Примечание:** 1.(\*)–выявлены возбудители туберкулеза (M.bovis); 2.(\*\*)-выявлены только атипичные микобактерии.

При культуральном исследовании рост M.bovis не отмечался, в одном случае (12,5 %) выделены атипичные микобактерии IV группы по классификации Раньона. Биологическая проба на морских свинках отрицательная в 100 % случаев.

При исследовании контрольной культуры M.bovis шт. 14 комбинированным и традиционным методами получен положительный результат.

Из всех исследуемых в ПЦР смывов были приготовлены мазки и окрашены по Циль–Нильсену, при микроскопии обнаружены как бактериальные формы в форме типичных красных палочек, так и измененные – в форме шаровидных клеток, зернистых элементов, нитевидных структур, обладающих пониженной жизнеспособностью.

#### Выводы:

1. Разработанный нами комбинированный «культурально-генетический» метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью и может применяться в качестве одного из основных методов для ранней диагностики туберкулеза крупного рогатого скота.

2. Комбинированный «культурально-генетический» метод дает не только возможность сократить сроки диагностических исследований на туберкулез в 6-20 раз в сравнении с традиционным бактериологическим методом, но и повысить надежность (информативность) культурального метода на 33,4 %. При необходимости определения видовой принадлежности возбудителей туберкулеза, выявленного комбинированным методом с комплексной тест-системой (МТБ-КОМ и др.), далее следует использовать в ПЦР соответствующие моновидовые праймеры (только M.bovis или M.tuberculosis).

Разработанный экспресс-метод может быть использован в обычных производственных ветеринарных лабораториях, занимающихся диагностикой туберкулеза крупного рогатого скота и имеющих оборудование для ПЦР.

#### Список литературы

1. Абдыраманова, Т.Д., Галатова, Л.В., Таллер, Л.А., Вассимирская Т.А., Шевцов А.С., Ощепков В.Г. Влияние фитодобавок на рост патогенных и атипичных микобактерий на питательной среде. // Сибирский вестник сельскохозяйственных наук. – 2008. – №3. – С. 103-105.
2. Донченко. Скорость и интенсивность роста M. bovis (шт.8 ВИЭВ) на различных питательных средах. / В.Н. Донченко, С.В. Ионина // Материалы Всероссийской научной конференции по проблеме хронических инфекций (16-17 мая 2001г.): Сборник научных трудов / РАСХН СО ВНИИБТЖ. – Омск – 2001. – С. 159-160.
3. Иртуганова, О.А. Современные возможности микобактериологической лаборатории // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – №4. – С. 21-35.
4. Найманов, А.Х., Овдиенко, Н.П., Осипова, Е.П. и др. ПЦР при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота // Ветеринария. – 2004. – №10. – С. 19-23.
5. Нуратинов, Р.А. Совершенствование питательных сред для бактериологической диагностики туберкулеза. / Р.А. Нуратинов, З.А. Казиахмедов, А.Х. Найманов, Н.П.Овдиенко // Материалы Междунар. Науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных». Москва, 2006, – С. 306-311.
6. Пат.2315812 Российская Федерация, МПК С12Q 1/04С12N1/20. Питательная среда выделения биологического материала и культивирования микобактерий / Слина К.Н., Лазовская А.Л., Воробьева З.Г., Кульчицкая М.А. заявл.05.06.06; опубл. 27.01.08, Бюл.№31.

#### THE ACCELERATED DIAGNOSTICS OF ANIMAL TUBERCULOSIS

**Oshchepkov V.G., Taller L.A., Sekin E.J., Vassimirskaia T.A., Slepchenko A.D.**

*State Scientific Institute All-Russia Scientifically-Research Institute of Animal Brucellosis and Tuberculosis of Siberian Department of the Russian Academy of Agricultural Sciences, Omsk*

*It was investigated 20 tests of a biomaterial from cattle, including 12 tests - with tubercular defeats and 8 tests without visually determined tubercular defeats, which after preliminary test-preparation were sowed on dense nutrient mediums (traditional and modified). For 3-5 day culturing from inoculations were prepared lavages and investigated by method PCR.*

*The results of researches confirm an opportunity of effective utilization of method PCR in veterinary laboratories as additional, allowing to reveal heavy growing and not cultivated micobacterium forms, thus raising reliability of research (up to 100 %), and considerably reducing terms of statement of the diagnosis (in 6 - 20 times).*