

На правах рукописи

Жабина Виктория Юрьевна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ
ОЦЕНКА ЭЛЕКТИВНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД
И ДЕЗИНФЕКТАНТОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата ветеринарных наук

Белгород – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина»

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук
Коваленко Анатолий Михайлович

Официальные оппоненты: **Коломиец Владислав Михайлович,**
доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» заведующий кафедрой фтизиопульмонологии

Стебловская Светлана Юрьевна,
кандидат ветеринарных наук, доцент ФГБОУ ВПО «Курская государственная сельскохозяйственная академия имени И.И.Иванова» доцент кафедры эпизоотологии, фармакологии и радиобиологии

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Защита диссертации состоится "19" мая 2015 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.040.03 при ФГБОУ ВПО «Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И.И. Иванова» по адресу: 305021, г. Курск, ул. К. Маркса, 70; тел. (4712) 53–13–30, факс (4712) 58–50–49.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И.И. Иванова» и на сайте www.kgsha.ru

Автореферат разослан: «__» марта 2015 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Рыжкова Галина Федоровна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Среди инфекционных болезней человека и животных особое место занимает туберкулез. С тех пор, когда Р.Кохом был открыт возбудитель туберкулеза, претерпели значительные изменения положения о развитии и проявлении инфекционного и эпизоотического процессов (Гулюкин М.И. с соавт. 2011, 2012; Данко Ю.Ю., 1998,1999; Донченко А.С. с соавт., 1995,1997; Найманов А.Х. с соавт., 2013,2014; Овдиенко Н.П. с соавт., 1999,2009; Ткаченко А.А., 2000; Шаров А.Н., 1982 и др.). В 20 веке возросла роль, так называемых атипичных микобактерий и их роль в патологии животных и людей (Ильинская З.Д., 1973; Каграманов А.И., 1963; Мартма О.В., 1971; Урбан В.П. с соавт., 1973, 1982,1987, 1995 и др.). Открытие L-форм у возбудителя туберкулеза заставило изменить и по новому решать вопросы диагностики и профилактики, эпизоотологии и эпидемиологии болезни (Васильев В.Н., 1971; Герман М.И.,1988; Дорожкова И.Р.1994; Кузин А.И., 1978 и др.). Нельзя до конца считать решенным вопрос о взаимосвязи различных видов микобактерий: патогенных, потенциально патогенных, атипичных и сапрофитов (Агапова М.Ф. с соавт., 2011; Бойко А.А. с соавт., 1991; Кассич Ю.Я., 1990; Кузин А.И., 1978; Кузьмин В.А. с соавт., 2012; Урбан В.П. с соавт., 1983; Шаров А.Н., 1982; Щуревский В.Е. с соавт., 1984 и др.).

Изменения, происходящие во взглядах на развитие инфекционного, эпидемического и эпизоотического процессов выделяют туберкулез в отдельную группу болезней, при которой объекты внешней среды имеют существенно важное значение в возникновении и распространении данной инфекции. Принимая во внимание, что развитие инфекционного и характер эпизоотического процесса определяют целый комплекс факторов, среди которых основная роль отводится возбудителю болезни, вопросы диагностики туберкулеза, в части аллергического и бактериологического методов диагностики, имеют существенно важное значение в определении эпизоотического статуса животноводческих хозяйств (Донченко А.С. с соавт., 1995; 1997; 2004; Епифанов А.В., 1999; Ткаченко А.А., 2000; Урбан В.П., 1967; 1971; 1973; 1995 и др.).

Исходя из выше изложенного, возникла необходимость изучения диагностической ценности аллергической диагностической пробы для выявления инфицированных животных, экспериментальной и производственной оценки разрабатываемых селективных питательных сред для выращивания микобактерий и апробации новых дезинфектантов для обеззараживания объектов внешней среды.

Степень разработанности темы исследования. Туберкулез относится к заболеваниям, при которых аллергия участвует как обязательный компонент основного патологического процесса (Авербах М.М. с соавт., 1976; Найманов А.Х., 1981, с соавт. 2014; Овдиенко Н.П. с соавт., 1996; Урбан В.П., Данко Ю.Ю., 1983; Урбан В.П.,

1966,1982,1983; Шаров А.Н., 1970 и др.). По своей природе туберкулиновая проба это высоко специфическая реакция иммунокомпетентных клеток с аллергеном (Авербах М.М. с соавт., 1976). Применительно к аллергической диагностике туберкулеза, по-прежнему проблемной задачей является своевременное выявление животных с латентной формой или в начале развития инфекционного процесса (Найманов А.Х., 2014).

В рутинной лабораторной практике низкие ростовые свойства микобактерий существенно затрудняют своевременное выделение и последующую видовую идентификацию микобактерий (Аликаева А.П., 1979; Букова Н.К. с соавт., 2004; Донченко А.С. с соавт., 2000,2006; Евглевский А.А. 2004; Корнева И.Н. с соавт., 2002; Тарасова Е.В. с соавт., 2012 и др.).

Особую значимость в системе мер борьбы с туберкулезом придается дезинфекции помещений и скотных дворов. В настоящее время для дезинфекции животноводческих помещений, наряду с известными средствами, предлагается целый ряд новых, качественно улучшенных дезинфектантов (Аржаков В.Н., 2002, с соавт., 2004; Березнев А.П. с соавт., 1990, 1994; Борознов С.Л. с соавт., 2006; Бутко М.П. с соавт., 2003; Высоцкий А.Э. с соавт., 2006 и др.). Выбор того или иного дезинфектанта определяется не только рекомендациями производителей. Большое значение имеют результаты независимых экспертиз, в том числе научно–производственных испытаний.

Поскольку для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота применяют при проведении бактериологических исследований методики первичного выделения на среде Левенштейна–Йенсена, которая имеет недостаточно высокую чувствительность к незначительным количествам микобактерий в посевном материале, а используемые средства воздействия на возбудителя во внешней среде являются малоэффективными, в связи с наличием у микобактерий восковой оболочки, была предпринята попытка разработки новой более эффективной плотной питательной среды для первичного выделения микобактерий и оценки применения экологически безопасных, анолитных дезинфицирующих растворов, приготовленных по технологии «АКВА–ЭХА».

Цель и задачи и исследований. Целью исследований является экспериментальная и производственная оценка элективных питательных сред для выращивания микобактерий и новых дезинфектантов для обеззараживания животноводческих объектов при туберкулезе крупного рогатого скота

В соответствии с целью были обозначены следующие задачи:

1. Изучить эпизоотическую ситуацию и диагностическую эффективность аллергической диагностической пробы при туберкулезе крупного рогатого скота.

2. Разработать новую, более эффективную плотную питательную среду для первичного выделения микобактерий из биоматериала, полученного от животных убитых с диагностической целью.

3. Провести сравнительное изучение ростовых свойств усовершенствованной полужидкой питательной среды Белгородской ГСХА и среды Дорожкой И.Р. для выделения L-форм микобактерий.

4. В экспериментальных и полевых опытах изучить возможность применения экологически безопасных, анолитных дезинфицирующих растворов, полученных по технологии «АКВА-ЭХА», для обеззараживания микобактерий туберкулеза.

Научная новизна. Разработана плотная питательная среда для первичного выделения микобактерий туберкулеза.

Экспериментально и в полевых условиях изучены обеззараживающие свойства новых экологически безопасных анолитных дезинфицирующих средств, приготовленных по технологии «АКВА-ЭХА». Показана целесообразность применения в системе противотуберкулезных мероприятий экологически безопасных анолитов с содержанием активного хлора 250–400 мг/л и рН 5–7.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании проведенных исследований определена эффективность и представлены предложения по использованию нового состава селективной питательной среды для выращивания микобактерий туберкулеза; применения новых, экологически безопасных анолитных дезинфицирующих средств, полученных по технологии «АКВА-ЭХА» с содержанием активного хлора 250–400 мг/л и рН 5–7.

Методология и методы исследования. Диссертационные исследования проводились на кафедре инфекционной и инвазионной патологии Белгородского государственного аграрного университета имени В.Я. Горина, в ОГБУ «Ракитянская ветеринарная станция по борьбе с болезнями животных», «Ракитянской межрайонной ветеринарной лаборатории», ООО "Семхоз Ракитянский" ММК с. Васильевка, Ракитянского района, Белгородской области в период с 2010 по 2014 гг.

Объект исследования: крупный рогатый скот в неблагополучном по туберкулезу хозяйстве.

Предмет исследования: ретроспективные и проспективные данные исследований по распространенности туберкулеза крупного рогатого скота ООО "Семхоз Ракитянский" ММК с. Васильевка Ракитянского района, Белгородской области, животные реагирующие на ППД – туберкулин, отобранный от убитых животных биоматериал, *M. bovis* и атипичные микобактерии, питательные среды для выделения микобактерий и L- форм, анолитные дезинфицирующие растворы.

Методы исследования.

В работе использовали эпизоотологический, клинический, иммунологический, микробиологический, патологоанатомический методы исследований.

Для сравнительной оценки интенсивности эпизоотического процесса (уровня заболеваемости), определяли индекс заболеваемости (I_3) – отношение числа заболевших животных к общему числу восприимчивых животных (в %) - по формуле:

$$I_3 = \frac{3 \times 100}{C_{II}} (\%)$$

где: 3–количество заболевших животных за год,
 C_{II} –среднегодовое поголовье животных.

Оценку эффективности аллергической диагностической пробы проводили в неблагополучном по туберкулезу крупного рогатого скота хозяйстве ООО «Семхоз Ракитянский» ММК с. Васильевка, Ракитянского района, Белгородской области с общим поголовьем крупного рогатого скота 3500 голов.

Для аллергических исследований использовали ППД – туберкулин для млекопитающих ФГУП Курской биофабрики серия 4, номер ПВР1–3,0/00424; серия 9, номер ПВР1–3,0/00424; серия 24, номер ПВР1–3,0/00424. Животных реагирующих на ППД–туберкулин подвергали диагностическому убою. Отобранный от убитых животных биоматериал (лимфатические узлы) использовали для бактериологического исследования. Посевы проводили на плотные (Левенштейна–Йенсена) и жидких питательные среды. Микроскопию мазков–отпечатков проводили из лимфатических узлов от реагирующих животных, окрашивая мазки по методике Циль–Нильсена.

Для полимеразной цепной реакции использовали 29 проб биоматериала и «Тест–систему для выявления и дифференциации возбудителей туберкулёза *M.bovis* и *M.tuberculosis*» производства НПО НАРВАК.

Схема опыта по изучению ростовых свойств питательных сред при исследовании патологоанатомического материала.

Использовали 75 проб биоматериала от убитых животных. Предпосевная обработка проводилась по методикам Аликаевой А.П. (1940) и Тарасовой Е.В. (2012) с использованием 3% раствора серной кислоты.

Предпосевная обработка заключалась в измельчении в фарфоровой ступке лимфатических узлов, добавления–3% раствора серной кислоты (экспозиция 5 минут) с последующим двукратным отмыванием в физиологическом растворе. Обработку биоматериала проводили следующим образом. Лимфатические узлы измельчали ножницами на кусочки размером 0,5×0,5 см³. Измельченный биоматериал помещали в стерильные ступки, заливали 3% раствором серной кислоты, выдерживали 15 минут. Затем кислоту сливали. Биоматериал трижды отмывали стерильным физиологическим раствором. Отмытый биоматериал тщательно растирали со стерильным песком до однородной массы, добавляя 15,0 см³ стерильного

физиологического раствора. Полученную взвесь фильтровали через стерильные мембранные фильтры диаметром 0,45 мкм. Посев взвеси (для исследования на наличие L-форм) после предпосевной обработки проводили по $0,3 \pm 0,05$ см³ в 10 пробирок на полужидкие среды Дорожковой И.Р., и питательную среду для выделения L-форм Белгородской ГСХА. Посев взвесей для получения бактериальных форм *M.bovis* проводили на среды Левенштейна-Йенсена и испытываемые варианты плотной питательные среды для первичного выделения микобактерий. Посевы культивировали в термостате при температуре $37,0 \pm 0,5$ °С в вертикальном положении.

Микроскопию L-форм микобактерий проводили с использованием фазово-контрастной микроскопии в темном поле. Бактериальные формы микроскопировали в световом микроскопе.

Для определения биохимических свойств культур микобактерий использовали биохимические тесты: каталазную, никотинамидазную, пиразинамидазную активность, 5% хлористым натрием и салицилатом натрия, теллуридом калия, мочевиной и твин-80, согласно Методическим рекомендациям по уточнению диагноза на туберкулез у крупного рогатого скота и определению видовой принадлежности культур микобактерий, Харьков (1987) .

Для постановки биопробы использовали здоровых не реагирующих на ППД-туберкулин морских свинок, весом 300–350 г. Морских свинок заражали гомогенатом из патологоанатомического материала и взвесью культур микобактерий в дозе 0,00001 мг/см³.

Схема опыта по изучению бактерицидных свойств анолитов приготовленных по технологии «АКВА-ЭХА» в камеральных условиях.

Готовили образцы испытываемых растворов: №1 с рН= 6–7 и содержанием активного хлора 250 мг/л.; №2 с рН $6 \pm 0,5$ и содержание активного хлора 400 мг/л.; №3 рН 5 и содержание активного хлора 300 мг/л.; №4 рН 9 и содержание активного хлора 300 мг/л. Раствор; №5 рН 4 и содержание активного хлора 300 мг/л.; №6 рН 10 и содержание активного хлора 300 мг/л. Оценку испытываемых образцов растворов проводили в сравнении с дезинфицирующими веществами (Кристалл-1000) и (Хлорантоин), 3%-ный NaOH (едкий натр).

Тест-объектами для контаминации микобактерий служили деревянные, стеклянные, керамические плитки размером 10×10 см. На плитки наносили по 1,0 мг/см³ взвеси *M.bovis*. Сразу же после контаминации плиток взвесью микобактерий их орошали дезинфицирующими средствами. Спустя 30 минут, 1–6 часов проводили смывы и посева на питательные среды Левенштейна-Йенсена (10 пробирок на каждую пробу).

Схема опыта по изучению выделяемости культур микобактерий из объектов внешней среды.

Проводили смывы и соскобы из объектов внешней среды на площади 10×10 см. Было отобрано 180 проб из кормушек, стен, поилок,

и прилегающей к ним территории (поверхность почвы и навоза). Соскобы и смывы после обработки по Аликаевой А.П. (1940) высевали на питательную среду Левенштейна–Йенсена (по 20 пробирок). Наблюдение за ростом культур осуществлялось каждые сутки. При появлении первичных, заметных колоний, проводили микроскопию. Типирование выделенных микобактерий проводили с учетом их ростовых свойств. биохимических исследований и постановки биопробы.

Схема опыта сравнительного изучения дезинфицирующих свойств растворов, полученных по технологии «АКВА–ЭХА» в условиях неблагоприятного по туберкулезу хозяйстве.

Оценку дезинфицирующих свойств испытуемых растворов проводили в полевых условиях неблагоприятного по туберкулезу хозяйства. После изучения контаминирования микобактериями различных объектов внешней среды. В качестве исследуемых объектов использовали кормушки, стены, поилки, поверхностные слои почвы. Обработывали животноводческие помещения испытуемыми дезинфицирующими растворами с использованием установки Karcher из расчета 1000 см³/м² и 3000 см³/м². В первом коровнике обработку проводили анолитным раствором с концентрацией активного хлора 250 мг/л, (рН 7). Во втором коровнике использовали анолитный раствор с концентрацией активного хлора 400 мг/л, (рН 6). В третьем коровнике применяли анолитный раствор с концентрацией активного хлора 300 мг/л с (рН 5). В четвертом коровнике использовали 3% р-р NaOH. Противомикробная активность испытуемых антисептиков изучались через 30 минут, 1, 3, 5 и 12 часов, путем посевов на питательную среду Левенштейна–Йенсена (по 10 пробирок).

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере с использованием пакета программ Microsoft Excel for Windows 7.

Основные положения, выносимые на защиту:

-Результаты изучения эффективности аллергической диагностической пробы при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота в условиях ООО "Семхоз Ракитянский" ММК Васильевка, Ракитянского района, Белгородской области.

-Плотная синтетическая элективная питательная среда для первичного выделения микобактерий туберкулеза из биоматериала.

-Результаты исследований по выделяемости микобактерий из объектов внешней среды в неблагоприятном по туберкулезу крупного рогатого скота хозяйстве.

-Оценка эффективности применения новых экологически безопасных анолитных дезинфицирующих растворов, полученных по технологии «АКВА–ЭХА» в условиях неблагоприятного по туберкулезу крупного рогатого скота хозяйстве.

Степень достоверности и апробация результатов.

Основные положения, выводы, практические рекомендации, приведенные в диссертации, научно обоснованы и подтверждены экспериментальными исследованиями.

Работа выполнена на должном методическом уровне. Исследования проведены на достаточном поголовье животных с соблюдением принципа сравнимости полученных результатов. В эпизоотологической части диссертационной работы использовались общепринятые методы эпизоотологического обследования хозяйств. Изложенные в диссертации научные положения полно и грамотно аргументированы большим количеством экспериментального материала. Достоверность полученных данных не вызывает сомнений, сделанные выводы логичны.

Основные положения доложены и обсуждены на заседании кафедры инфекционной и инвазионной патологии Белгородского государственного аграрного университета (2014 – 2015); конкурсном отборе по программе "Участник Молодежного Научно Инновационного Конкурса 2011" (УМНИК– 2011); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений МСХ РФ в ЦФО в номинации "Ветеринарные науки" (Диплом за победу во II этапе, 2012г.); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений МСХ РФ в номинации "Ветеринарные науки" (Грамота за III этап, 2012г.); XXVII Международной научно–практической конференции «Естественные и математические науки в современном мире» НП «СибАК» (г. Новосибирск, 2015г.); XI Международной научно–практической конференции «Стратегические вопросы мировой науки 2015». (Польша, 2015г.).

По теме работы опубликовано 6 научных статей, разработаны методические рекомендации.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах компьютерного текста и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список сокращений и условных обозначений, список используемой литературы, список иллюстрированного материала (всего 228 источников, из которых 44 иностранных). Диссертация иллюстрирована 14 таблицами и 8 рисунками.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика эпизоотической ситуации по туберкулезу крупного рогатого скота в Российской Федерации

В целом с 2008 по 2013 годы количество неблагополучных пунктов по туберкулезу крупного рогатого скота в РФ уменьшилось от 82 до 33. Количество оздоравливаемых пунктов снижалось с 33 до 6. Количество больных животных в 2008 г. составляло–5014, а в 2013 году –2370. А наивысший уровень заболеваемости туберкулезом был отмечен в 2008 году (0,053%). С 2009 по 2011этот индекс снизился в 2,5 раза. В последующие 2012, 2013 гг. уровень индекса заболеваемости вырос до 0,028 % и 0,026 % соответственно. В целом по РФ индекс заболеваемость с 2008 по 2013 составил 0,027% (рис.1).

Наиболее напряженная эпизоотическая ситуация по туберкулезу крупного рогатого скота наблюдалась в животноводческих хозяйствах Белгородской области. Так только за 2009 год в одном из неблагополучных хозяйств было убито с диагностической целью реагирующего на ППД – туберкулин скота 349 голов, что составило 24% от общего числа убитых и было обнаружено 13% туш с характерными для туберкулеза патологоанатомическими изменениями.

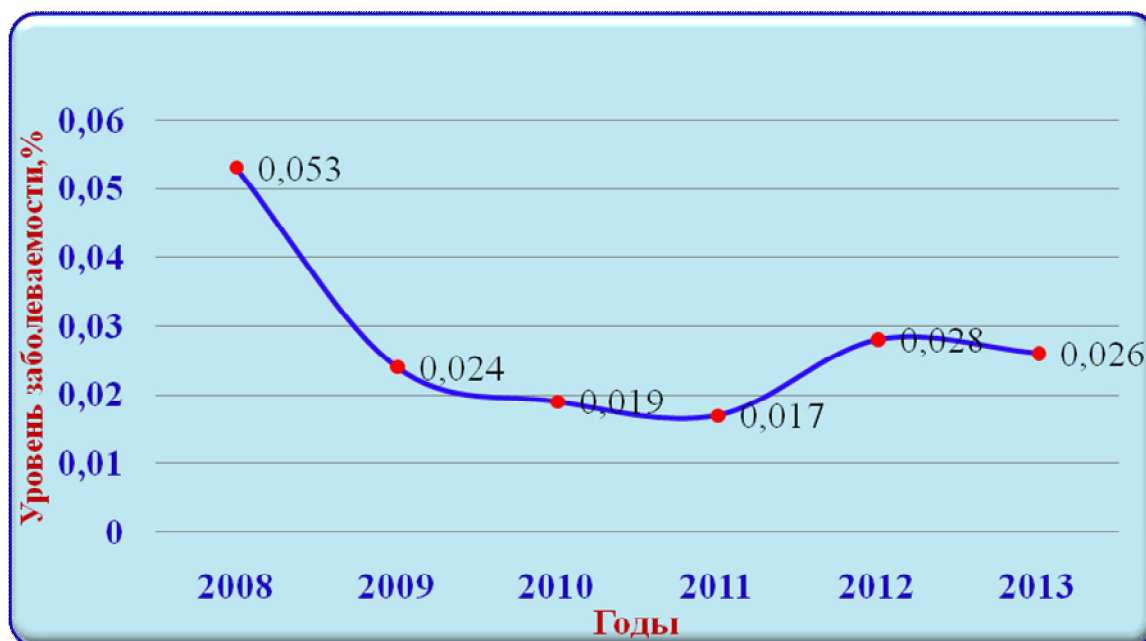


Рисунок 1 - Заболеваемость туберкулезом крупного рогатого скота в Российской Федерации с 2008 по 2013 гг.

Принимая во внимание вышеизложенные эпизоотологические данные, можно сделать заключение, о том что эпизоотическая ситуация по туберкулезу крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах РФ имеет характер постоянного устойчивого неблагополучия в ряде регионов.

2.2. Эпизоотический статус ООО "Семхоз Ракитянский" ММК с. Васильевка, Ракитянского района, Белгородской области

"Семхоз Ракитянский" является неблагополучным по туберкулезу с ноября 2012 года. В период с 2012 по 2013 гг., в этом хозяйстве было подвергнуто ежемесячным аллергическим исследованиям 21329 голов крупного рогатого скота. Было выявлено 775 голов реагирующих на ППД–туберкулин для млекопитающих. Все реагирующие животные подверглись диагностическому убою с проведением патологоанатомических и бактериологических исследований. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1- Количество животных с туберкулезными изменениями в лимфатических узлах

Показатели	Период проведения исследований								
	2012		2013						
	Ноябрь	Декабрь	Январь	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь	Июль
Реагирующих животных, голов	194	99	94	166	117	58	43	7	55
С туберкулезными поражениями	133	32	32	63	16	6	15	–	2
в т.ч.: голов / %	68,5	32,3	34,0	37,9	13,7	0,3	34,9	–	3,6

С ноября (2012) по январь (2013) наблюдалась тенденция постепенного уменьшения в 2 раза количества реагирующих животных. В феврале (2013) количество реагирующих животных увеличилось в 1,8 раза, а в дальнейшем продолжилась тенденция уменьшения выявляемости количества реагирующих животных. Что касается присутствия у этих особей патологоанатомических изменений, свойственных туберкулезной инфекции, то в этот период исследований данный показатель тоже имел тенденцию к постепенному уменьшению и в июне (2013) понизился в 21 раз против ноября (2012). Данная корреляционная зависимость прерывалась в июле (2013) и характеризовалась увеличением, как числа реагирующих на ППД–туберкулин животных в 7,8 раза, так и выявляемостью особей с туберкулезными патологоанатомическими изменениями в 8,2 раза. Это свидетельствует о понижении чувствительности и специфичности АДП в стационарно–неблагополучном хозяйстве, что связано по всей видимости с увеличением количества анергичных животных.

2.3. Динамика выявления животных реагирующих на ППД–туберкулин для млекопитающих

В целом, применение аллергического метода диагностики с использованием ППД – туберкулина для млекопитающих в условиях неблагополучного по туберкулезу хозяйства позволило выявлять от 3,6% до 68% особей с активным развитием туберкулезного процесса. У большинства животных с высокой интенсивностью проявления кожной реакции на туберкулин, обнаруживали или туберкулезные поражения или, незначительные увеличения средостенных и бронхиальных лимфатических узлов. На разрезе, которых имело место наличие точечных кровоизлияний.

Для объективной оценки чувствительности и специфичности АДП необходимо было применить современные молекулярно–генетические тесты, способные проводить прямую детекцию ДНК *M.bovis*.

2.4. Эффективность применения молекулярно–генетического теста при исследовании биоматериала на туберкулез

Методом ПЦР было исследовано 29 проб биоматериала из них 20 от не реагирующих на туберкулин животных и 9 от реагирующих в АДП с утолщением кожной складки от 3 до 7 мм. Наличие в ампликонах ДНК *M. bovis* установлено у 27 проб (93%)

В 5 пробах биологического материала отобранных от особей не реагирующих на ППД–туберкулин и не имеющих туберкулезных патизменений было детектировано наличие последовательностей ДНК *M. bovis* в 71% случаев, что свидетельствует о высокой чувствительности данного теста.

Таким образом, прямой метод детекции ДНК возбудителя туберкулеза (ПЦР) позволяет в 90% и более выявлять ничтожно малые количества ДНК *M.bovis* в инфицированном микобактериями биоматериале еще до проведения бактериологических исследований, что по времени опережает точность постановки первичного диагноза на туберкулез.

2.5. Результаты поисковых исследований по разработке плотной синтетической селективной питательной среды для первичного выделения микобактерий

При разработке плотной питательной среды для первичного выделения микобактерий использовали в мас /%: аммоний лимоннокислый–1,5; калий фосфорнокислый двузамещенный–2,0; магний сернокислый семиводный–0,2; железо сернокислое –0,1; сернокислый цинк–0,1; гликокол–2,0; фумаровая кислота–2,0; натрий фосфорнокислый двузамещенный–0,5; хлористый натрий–0,3;

глицерин– 20,0; агар–агар–23,0; глицин 1,5; остальное вода. рН был $7,2 \pm 0,2$.

Навески аммония лимоннокислого растворяли в горячей дистиллированной воде. Другие соли и глицерин в указанной выше последовательности добавляли в теплую дистиллированную воду. После полного растворения добавляли 23,0 г. агар–агара. рН среды доводили до нужных параметров дробным добавлением гидроксида натрия. Стерилизацию проводили автоклавированием в режиме 120°C в течение 30 минут.

Первичный рост микобактерий туберкулеза *M.bovis* на применяемой среде был отмечен на 15–16 сутки в виде (1–2) колоний с маковое зерно, бугорчатых белого цвета. При посеве надосадочной жидкости из биоматериала на испытываемую плотную питательную среду первичный рост колоний наблюдали на 17–18 сутки. Было выделено 27 культур *M.bovis*.

На среде Левенштейна–Йенсена (контроль) рост микобактерий отмечали в виде единичных с просыное зерно бугорчатых образований, на 18–19 сутки. Было выделено 21 культура, что на 6 меньше в сравнении с плотной питательной средой для первичного выделения микобактерий.

Использование предлагаемой среды позволяет ускорить процесс получения первичных культур микобактерий в среднем от 3 до 5 суток по сравнению со средой Левенштейна–Йенсена.

Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты сравнительного изучения ростовых свойств испытываемой плотной питательной среды

№ п/п	Пат. материал	(n) проб. биоматериала МБТ / взвесь мг/мл	Рост на испытываемых плотных питательных средах						Рост на среде Левенштейна – Йенсена (контроль)	
			Среда №1		Среда №2		Среда №3		Выделено в сутки	(n) культур
			Выделено в сутки	(n) культур	Выделено в сутки	(n) культур	Выделено в сутки	(n) культур		
1.	Штамм <i>M.bovis</i>	– /0,00001 мг/мл	$15 \pm 0,1$	–	$17 \pm 0,3$	–	$19 \pm 0,3$	–	$18 \pm 0,2$	–
2.	(n) проб с пат. изменения ми	9/–	$17 \pm 0,2$	9	$21 \pm 0,4$	9	$28 \pm 0,1$	9	$30 \pm 0,3$	9
3.	(n) проб без пат. изменения ми	20/–	$17 \pm 0,2$	18	$24 \pm 0,2$	15	$30 \pm 0,1$	12	$34 \pm 0,3$	12

Разработаны методические рекомендации по применению питательных сред для выделения *M.bovis* и L-форм, утв. метод. комиссией ФВМ БелГСХА им. В.Я. Горина протокол № 4 от 17 декабря 2014г.).

2.6. Изучение влияния методов предпосевной обработки биоматериала на рост микобактерий, в том числе L-форм при посевах на питательные среды

При применении предпосевной обработки биоматериала по Аликаевой А.П. (1940), было выделено: на среде Левенштейна–Йенсена–18 (24%) культур микобактерий, а на плотной питательной среды для первичного выделения микобактерий–21 (28%). Рост микобактерий на среде Левенштейна–Йенсена проявился на 20–21 сутки, а на плотной питательной на 14–15 сутки. На среде Левенштейна–Йенсена было выявлено 7 культур в R-форме, 11– S-форме, а на плотной питательной среде для выделения микобактерий в R-форме–16, S-форме–5. Загрязненность посевов при использовании предпосевной обработки по Аликаевой А.П. составила $0,6\pm 0,009\%$ на среде Левенштейна–Йенсена и плотной питательной среде $0,5\pm 0,009\%$.

При применении 3% раствора серной кислоты было выделено: на среде Левенштейна–Йенсена 21 (28%) культура микобактерий, а на плотной среде–22 (29,3%). Первичный рост наблюдался на 18–19 сутки и 16–17 сутки, соответственно. При этом на среде Левенштейна–Йенсена в R-форме –8, S-форме –12, а на плотной питательной среде в R-форме–16, S-форме–6. Загрязненность посевов с использованием предпосевной обработки 3-% раствором серной кислоты составила на среде Левенштейна–Йенсена $1,2\pm 0,009\%$ и на плотной питательной для первичного выделения микобактерий $0,95\pm 0,009\%$.

Что касается L-форм микобактерий, то они получены только после обработки 3% раствором серной кислоты. При этом на среде И.Р. Дорожковой – 13, а на испытуемой питательной среде Белгородской ГСХА 18 культур L – форм.

Применение предпосевной обработки с использованием 3% раствора серной кислоты позволило выделить на среде Дорожковой–54 (72%) культуры L-форм микобактерий; на среде Белгородской ГСХА–57 (76%). Первичный рост культур L-форм наблюдали на 15–16 сутки и 14–15 сутки, соответственно. Загрязненность посевов при использовании предпосевной обработки с использованием 3-% раствора серной кислоты составила $1,3\pm 0,01\%$ на среде Дорожковой И.Р. и $1,1\pm 0,02\%$ на среде Белгородской ГСХА

Плотная питательная среда для первичного выделения микобактерий позволила выявлять на 5 суток раньше первичный рост микобактерий. При этом выделяемость используемой *M.bovis* была на 3 (14,2%) культуры больше. А при использование предпосевной обработке с применением 3% раствора серной кислоты рост начался на 2 суток раньше и удалось выделить на одну культуру больше.

По своим ростовым свойствам: питательная среда для выделения L-форм микобактерий позволила выявить на 4 (22,2%) суток раньше L-формы в сравнении со средой Дорожковой И.Р.

2.7. Изучение сравнительной эффективности дезинфицирующих средств

Из объектов внешней среды были выделены 30 культур микобактерий из них 9 *M.bovis* и 21 атипичные микобактерии относящихся, к различным группам по классификации Раньона: со стен-5, пола-4, окон-3, кормушек-4, поилок-5, образцов поверхностного грунта-3, навоза-3,силоса-2 и сена-1 культуры. Это свидетельствует о развитии в данном неблагополучном пункте, среди поголовья как микобактериозов так и истинного туберкулеза.

Изучением дезинфицирующих свойств анолитных растворов, полученных по технологии «АКВА-ЭХА», установлено, что наиболее устойчивые показатели бактерицидности наблюдались у растворов с содержанием активного хлора 250-400 мг/л и рН 5-7. При использовании этих растворов при посевах смывов на среду Левенштейна-Йенсена (роста не наблюдалось в течение 3-х месяцев после посева). Дезинфицирующие препараты (прототипы), имеющие в своём составе соединения пергидроля и хлорсодержащие компоненты "Хлорантоин" и "Кристалл-1000", уступали по своему бактерицидному действию, что проявлялось ростом на $28 \pm 0,6$ и $29 \pm 0,2$ сутки в виде единичных, (с просыное зерно бело-кремневого цвета колоний). Полученные данные представлены в таблице 3.

Данное бактерицидное действие электрохимических растворов обусловлено низкой минерализацией анолита, его повышенной гидратационной способностью, что способствует увеличению проницаемости клеточных стенок и мембран, создаёт условия для интенсивного осмотического и электроосмотического переноса оксидантов во внутриклеточную среду. Можно утверждать, что осмотический перенос оксидантов через оболочки и мембраны микробных клеток проявляется интенсивнее, ввиду существенного различия осмотического градиента этих клеток. Ускоренному электроосмотическому переносу оксидантов внутрь бактериальных клеток способствуют многочисленные электрически заряженные микропузырьки электролизных газов, создающие в зонах контакта с биополимерами мощные локальные электрические поля с высокой степенью неоднородности. По всей видимости, полученные анолитные дезинфицирующие растворы, обладают наиболее стойкими бактерицидными свойствами с постоянным рН (от 5 до 7). В контрольных исследованиях, где применялся едкий натр, обеспечивалось полное уничтожение микобактерий. В контроле (где использовали дистиллированную воду) были выявлены ожидаемые

результаты т.е. на питательных средах наблюдали сплошной рост микобактерий на 9–10 сутки.

Таблица 3 - Изучение бактерицидных свойств электрохимических растворов на культуре *M.bovis*

№ п/п	Испытуемые вещества	Рост колоний МБТ на сутки	Характеристика роста колоний МБ на питательной среде Левенштейна–Йенсена из проб, полученных на деревянных тест–объектах
	Электрохимические растворы по технологии «АКВА–ЭХА»		
1.	№1	–	Рост отсутствует
2.	№2	–	Рост отсутствует
3.	№3	–	Рост отсутствует
4.	№4	39±0,4	Единичные колонии с просяное зерно бело-кремового цвета
5.	№5	48±0,3	Единичные колонии с просяное зерно бело-кремового цвета
6.	№6	29±0,2	Колонии с просяное зерно бело-кремового цвета
Аналоги			
7.	Кристалл 1000	29±0,3	Множественные сливающиеся колонии белого цвета
8.	Хлорантоин	28±0,6	Множественные колонии, переходящие в сплошной налёт кремового цвета
Контроль			
9.	Контроль	9±0,3	Сплошной рост в виде налёта бело–кремового цвета
10.	Контроль едкий натрий		Рост отсутствует

Проведенные исследования позволяют сделать заключение о том, что экологически безопасные анолитные бактерицидные растворы, с рН 5–7 и концентрацией активного хлора 250–400 мг/л превосходят по своим дезинфицирующим свойствам обычно применяемый 3% NaOH и могут успешно применяться, как для профилактической, так и вынужденной дезинфекции в хозяйствах неблагополучных по туберкулезу крупного рогатого скота (Методические рекомендации по применению экологически безопасных дезинфицирующих растворов, приготовленных по технологии «АКВА–ЭХА» при туберкулезе крупного рогатого скота, утв. метод. комиссией ФВМ БелГСХА им. В.Я. Горина протокол № 4 от 17 декабря 2014г.).

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Эпизоотическая ситуация по туберкулезу крупного рогатого скота в РФ (2008–2013гг.) характеризуется устойчивым неблагополучием, что подтверждается 0,027% уровнем заболеваемости.

2. Применение аллергического метода диагностики с использованием ППД – туберкулина для млекопитающих в условиях неблагополучного по туберкулезу крупного рогатого скота хозяйства позволяет выявлять от 3,6% до 68% особей с активным развитием туберкулезного процесса.

3. Разработана плотная питательная среда для ускоренного выделения микобактерий, включающая в своем составе: аммоний лимоннокислый; калий фосфорнокислый двузамещенный; магний сернокислый семиводный; железо сернокислое; сернокислый цинк; гликокол; фумаровая кислота; натрий фосфорнокислый двузамещенный; хлористый натрий; глицерин; агар–агар; глицин, позволяющая увеличить на 14,2% выделяемость *M.bovis* в сравнении со средой Левенштейна–Йенсена. Период выявления первичных культур сокращается в среднем на 5 суток.

4. При лабораторном тестировании полужидкой питательной среды Белгородской ГСХА со средой Дорожковой И.Р. выделяемость культур микобактерий в L–форме составила 57 (76,0%) против 54 (72,0%), соответственно.

5. Анолитные экологически безопасные растворы, получаемые по технологии «АКВА–ЭХА» с рН 5–7 и содержанием активного хлора в пределах 250–400 мг/л, обладают высокими бактерицидными свойствами, что обеспечивает полную инактивацию *M.bovis*, и делает возможным их применение в качестве альтернативы экологически вредному гидроксиду натрия при проведении дезинфекции животноводческих объектов неблагополучных по туберкулезу хозяйств.

4. РЕКОМЕНДАЦИИ, ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для первичного выделения культур микобактерий рекомендуется использовать плотную минеральную питательную среду, включающую в своем составе мас /%: аммоний лимоннокислый–1,5; калий фосфорнокислый двузамещенный–2,0; магний сернокислый семиводный–0,2; железо сернокислое–0,1; сернокислый цинк–0,1; гликокол–2,0; фумаровая кислота–2,0; натрий фосфорнокислый двузамещенный–0,5; хлористый натрий–0,3; глицерин–20,0; агар–агар–23,0; глицин–1,5; остальное вода. Методические рекомендации по применению питательных сред для выделения *M.bovis* и L–форм, утверждены методической комиссией факультета ветеринарной медицины БелГСХА им. В.Я. Горина протокол №4 от 17 декабря 2014г.

2. В системе оздоровительных мероприятий при туберкулезе, применять экологически–безопасные анолитные растворы с

содержанием активного хлора 250–400 мг/л и показателями рН от 5 до 7. Методические рекомендации по применению экологически безопасных дезинфицирующих растворов, приготовленных по технологии «АКВА–ЭХА» при туберкулезе крупного рогатого скота, утверждены методической комиссией ФВМ БелГСХА им. В.Я.Горина протокол №4 от 17 декабря 2014г.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, из списка рекомендованных ВАК Минобразования и науки РФ

1. Жабина В.Ю. Изучение биологических свойств L–форм микобактерий, выделенных из бронхиальных и средостенных лимфатических узлов от КРС, реагирующего на ППД – туберкулин / А.М. Коваленко, Е.В. Тарасова, В.Ю. Жабина // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – Курск, 2012. – №4. – С. 53–55.

2. Жабина В.Ю. Диагностическая ценность аллергической пробы при проведении противотуберкулезных оздоровительных мероприятий / А.М. Коваленко, В.Ю. Жабина // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – Курск, 2014. – №8. – С. 73–74.

3. Жабина В.Ю. Экспериментальное исследования по изучению диагностической ценности лабораторных методов при туберкулезе крупного рогатого скота / А.М. Коваленко, В.Ю. Жабина // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. –Курск, 2014. –№9. – С. 73–75.

Прочие публикации, содержащие основные научные результаты диссертации

4. Жабина В.Ю. Изучение культуральных свойств усовершенствованной питательной среды для выделения микобактерий / В.Ю. Жабина, А.М. Коваленко // Естественные и математические науки в современном мире / Сб. ст. по материалам XXVII междунар. науч.–практ. конф. № 2 (26). Новосибирск: Изд. «СибАК», – 2015. – С. 166–171.

5. Жабина В.Ю. Диагностическая ценность лабораторных тестов при туберкулезе крупного рогатого скота / А.М. Коваленко, Е.В. Тарасова, В.Ю. Жабина // Инновации в АПК: проблемы и перспективы. ФГБОУ ВПО БелГСХА им. В.Я.Горина. – Белгород, – 2014. – №2. – С. 103–107.

6. Жабина В.Ю. Сравнительная эффективность экологически безопасных дезинфицирующих средств при воздействии на микобактерии туберкулёза / В.Ю. Жабина, А.М. Коваленко // Materiały XI Międzynarodowej naukowo–praktycznej konferencji «Strategiczne pytania światowej nauki – 2015» Volume 16. Nauk biologicznych. Rolnictwo. : Przemysł. Nauka i studia – 85–90 str.

Методические рекомендации

7. Методические рекомендации по применению питательных сред для выделения *M.bovis* и L–форм, утв. метод. комиссией ФВМ БелГСХА им. В.Я. Горина протокол № 4 от 17 декабря 2014г.

8. Методические рекомендации по применению экологически безопасных дезинфицирующих растворов, приготовленных по технологии «АКВА–ЭХА» при туберкулезе крупного рогатого скота, утв. метод. комиссией ФВМ БелГСХА им. В.Я. Горина протокол № 4 от 17 декабря 2014г.

Формат 60x84 1/16. Бумага для множительных аппаратов.

Печать на копировальном аппарате КГСХА.

Усл. печ. л. 1,0. Уч.-изд. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ № 47.

