

УДК 619:616.98:579.873.21(476.1)

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРОСКОПИИ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДОВ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА НА ПОВЕРХНОСТЯХ

При проведении противотуберкулезных мероприятий, помимо ранней диагностики и удаления из стада зараженных животных, важное значение имеет оценка контаминации животноводческих помещений и окружающей территории возбудителем туберкулеза. Это необходимо как для прогнозирования эпизоотической ситуации, так и повышения эффективности карантинных мероприятий, в частности оценки качества дезинфекции.

А.Э. ВЫСОЦКИЙ (Минская областная ветеринарная станция);
А.П. ЛЫСЕНКО, А.И. ПОЛОЗ (БелНИИЭВ им. С.Н. Вышелесского)

Известно, что больные животные выделяют возбудитель с молоком (8,3 - 14%), мокротой (16,8 - 30%), фекалиями (6,8%), мочой (5,5%) /Р.В. Тузова, 1983/. Исследования, проведенные в БелНИИЭВ им. С.Н. Вышелесского показывают, что и в отдельных благополучных по туберкулезу стадах могут встречаться животные, в организм которых попадали микобактерии бычьего или человеческого вида (3). Встреча с небольшой дозой возбудителя, благодаря значительной генетической устойчивости крупного рогатого скота, обычно заканчивается развитием защитных иммунных реакций и подавлением инфекции. Основная часть таких животных выявляется туберкулиновой пробой и, как правило, сдается на убой, что препятствует формированию стойких очагов болезни. Однако даже при благоприятном исходе инфекционного процесса происходит размножение и выделение возбудителя во внешнюю среду, хотя бы в незначительных количествах. Поэтому даже в благополучных по туберкулезу хозяйствах, где выявляют реагирующих на туберкулин животных в животноводческих помещениях, возможно наличие небольших количеств возбудителя туберкулеза. Для достижения устойчивого благополучия стад по туберкулезу своевремен-

ное выявление возбудителя туберкулеза во внешней среде и проведение санации помещений, на наш взгляд, гораздо важнее и выгоднее, чем частое обследование поголовья туберкулиновой пробой и сдача на убой реагирующих животных.

К сожалению, ветеринарные специалисты практически не уделяют внимания изучению контаминации внешней среды, а, с другой стороны, методы выявления возбудителя туберкулеза остаются достаточно громоздкими, и их реальная эффективность фактически неизвестна.

Для выявления возбудителя туберкулеза во внешней среде применяют световую и люминисцентную микроскопию, культуральный, биологический метод и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) /Субботина С. Г., 1999, Колычев Н.М., 1991/. Однако использование культурального и биологического метода при обследовании сильно загрязненных объектов проблематично. ПЦР - недостаточно изучена и дорога, а, кроме того, по чувствительности может уступать световой микроскопии /Cartuyvels et al, 1996/. Известно, что при диагностике туберкулеза у человека микроскопия мазков мокроты позволяет выявить микобактерии при их содержании от 5 тыс. до 10 тыс. в 1 мл пробы.

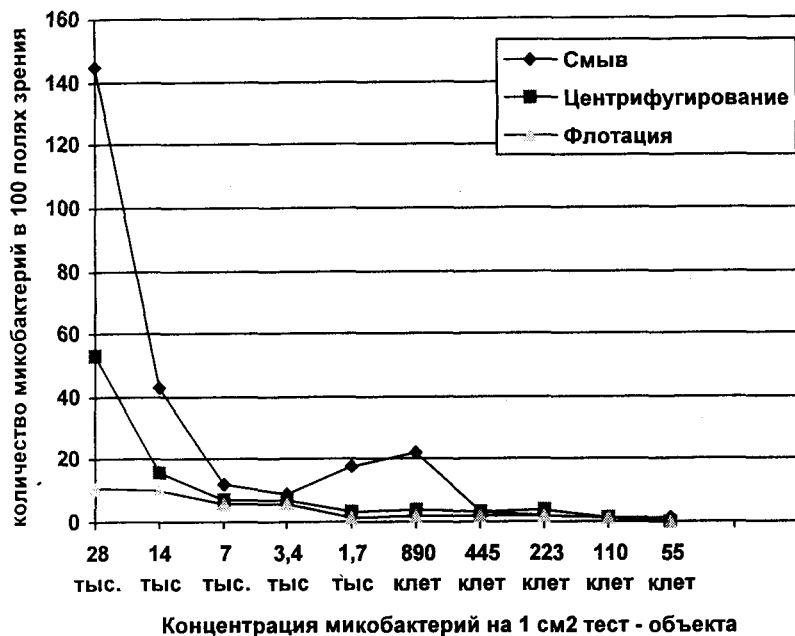


Рис. 1. Среднее число обнаруживаемых микробактерий в зависимости от их концентрации на тест-объекте.

Целью работы было определение чувствительности световой микроскопии мазков с инфицированных поверхностей и влияние на этот показатель способ концентрирования исследуемого материала.

Материалы и методы исследований. В работе использовали суспензию штамма БЦЖ с концентрацией 50 млн. микробных тел в 1 мл и показателем дисперсности не менее 1,5. Суспензию разводили 0,9% раствором хлорида натрия и разведениями инфицировали тест-объекты (дерево, кирпич) площадью 18 см², по 1 мл. После высыхания тест-объекты покрывали цельной сывороткой крови лошади и разведенным 1:10 навозом, после чего вы-

Мазки окрашивали общепринятым методом по Циль - Нильсену и просматривали в соответствии с требованиями «Микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза» (М. 1995). Использовали световой бинокулярный микроскоп с иммерсионным объективом 90 и окуляром 7х. Мазки просматривали в 9 параллельных проходах по ширине, что соответствует 100 полям зрения микроскопа.

Результаты исследований.

Результаты исследования контаминированных тест-объектов суммированы в таблицах 1, 2 и рисунке 1.

Установлено, что при наличии защитной пленки на тест-объектах, образуемой сывороткой крови микробактерии были выявлены практически, во всех

разведениях от 2,7 млн. до 223 клеток на 1 см² поверхности. При относительно высокой концентрации клеток микробактерии в больших количествах выявлялись на кирпиче. По мере снижения концентрации число находок на кирпиче и дереве выравнивалось. Наименьшее число находок отмечено при использовании флотации, примерно одинаковую чувствительность обеспечивали центрифугирование и обычный смыв. С применением последнего метода удалось обнаружить микробактерии даже при концентрации 223 клетки на 1 см², хотя достаточно четко они выявлялись до концентрации 445 клеток на 1 см².

1. Результаты микроскопии мазков с тест-объектов, обработанных лошадиной сывороткой

Метод	Степень разведения (количество микробных тел на 1 см² тест-объекта) и число обнаруженных микробактерий в 100 полях зрения									
	50 млн. (2,7 млн см²)	5 млн. (277 тыс. см²)	500 тыс. (28 тыс. см²)	250 тыс. (14 тыс. см²)	125 тыс. (7 тыс. см²)	62 тыс. (3,4 тыс. см²)	31 тыс. (1,7 тыс. см²)	16 тыс. (890 клет. см²)	8 тыс. (445 клет. см²)	4 тыс. (223 клет. см²)
Смыв	3800/160	100/1000	200/90	100/40	1/40	2/20	2/60	2/80	2/4	4/2
Центрифугирование	1800/2	200/3	100/6	15/4	6/3	8/2	0/2	4/0	3/1	0/15
Флотация	800/4	6/32	0/0	3/20	0/12	3/4	0/2	2/0	3	2/3

сушивали.

С поверхностей тест-объектов делали смывы с последующей концентрацией методом флотации («Инструкция по проведению ветеринарной дезинфекции объектов животноводства») и центрифугированием при 5000 об/мин.

Во второй серии опытов при обследовании тест-объектов с защитной пленкой навоза центрифугирование и флотации обеспечили несколько более высокую чувствительность, чем смыв. Единичные находки имели место даже при концентрации 55 клеток на 1 см².

2. Результаты микроскопии мазков с тест - объектов, покрытых суспензией навоза

Метод	Степень разведения (количество микробных тел на 1 см ² тест - объекта) и число обнаруженных микобактерий в 100 полях зрения									
	250 тыс. (14 тыс. см ²)	125 тыс. (7 тыс. см ²)	62 тыс. (3,4 тыс. см ²)	31 тыс. (1,7 тыс. см ²)	16 тыс. (890 клет. см ²)	8 тыс. (445 клет. см ²)	4 тыс. (223 клет. см ²)	2 тыс. (110 клет. см ²)	1 тыс. (55 клет. см ²)	500 клет. (27 клет. см ²)
Смыв	16/16	0/4	10/5	7/4	4/2	2/2	0/0	1/1	1/0	0/0
Центрифугирование	14/32	6/12	9/8	2/8	2/10	1/8	2/0	0/3	0/0	0/0
Флотация	14/3	6/9	9/6	2/0	2/3	1/4	2/1	0/2	0/0	0/0

Примечание: в числителе количество обнаруженных микобактерий с кирпича, в знаменателе с дерева.

Обсуждение результатов. Известно, что наиболее чувствительным методом выявления возбудителей инфекционных болезней является полимеразная цепная реакция, позволяющая в оптимальных условиях выявлять до 50 клеток в 1 мл. пробы /Обухов И. Л. и др. 1997/. Вместе с тем применение такого простого и дешевого метода, как световая микроскопия, обеспечило выявление возбудителя в концентрации 2000 клеток на 1 мл наносимой на тест - объекты или 110 клеток на 1 см² поверхности.

Неожиданной была примерно одинаковая эффективность методов подготовки материала для исследования. Основным рекомендуемым методом считается флотация, однако достигаемая с ее помощью чувствительность в ряде случаев была ниже, чем у обычного смыва. В целом предпочтение стоит отдать центрифугированию, а при отсутствии такой возможности - смыву.

Ценность метода несколько снижает способность атипичных микобактерий, давать такую же окраску в мазках, как и возбудитель туберкулеза. Поэтому интерпретация результатов обследования, отчасти, носит субъективный характер. Вместе с тем, данные иммунолюминесцентной микроскопии, позволяющей идентифицировать возбудитель туберкулеза показывают, что его клетки обычно тонкие и зернистые, не образуют скоплений, расположены по одиночке, так как во внешней среде он не размножается (3). Атипичные микобактерии располагаются кучками и, как правило, полиморфны. Использование таких критериев оценки находок микобактерий в мазках позволяет с известной вероятностью судить об их групповой принадлежности. Ценность метода световой микроскопии безусловно бы возросла при разработке способов дифференциальной окраски возбудителя туберкулеза и атипичных микобактерий.

Заключение. Световая микроскопия мазков является высокочувствительным методом обнаружения микобактерий даже при загрязнении поверхностей органическими веществами. Она позволяет выявить возбудитель туберкулеза в концентрации 110 клеток

на 1 см² поверхности.

Для концентрирования микобактерий целесообразно использовать центрифугирование, а при отсутствии технических возможностей обычный смыв тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором.

Полученные данные можно использовать для оценки степени контаминации животноводческих помещений микобактериями туберкулеза и эффективности оздоровительных мероприятий.

Литература

1. Колычев Н. М., Кассич Ю. Я., Мартма О. В. и др. Туберкулез сельскохозяйственных животных. - М.: Агропромиздат, 1991. - 255с.
2. Колычев Н. М. Методы индикации и обезвреживания микобактерий туберкулеза на объектах внешней среды: Дис. ...д.в.н. - Казань, 1984. - 37с.
3. Лысенко А. П., Агеева Т. Н., Румачик И. И. и др. Контаминация объектов внешней среды возбудителем туберкулеза в неблагополучных хозяйствах // Проблемы патологии, санитарии и бесплодия в животноводстве. - Мн., 1998, с.64-65.
4. Субботина С. Г., Жмуров Н. Г., Сапожкова О. А. и др. Идентификация микобактерий туберкулеза по культуральным свойствам // Экологические аспекты эпизоотологии и патологии животных. - Воронеж, 1999, с. 170-172.
5. Тузова Р. В. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птицы. - Мн.: Ураджай, 1983. - 263с.
6. Обухов И. Л., Груздев К. Н., Панин А. Н. Использование полимеразной цепной реакции в практических ветеринарных лабораториях // Ветеринария. 1997. № 5. С. 24-26.
7. Cartuyvels R., De Rider C., Jonckheere S. And al. Prospektiv Clinical Evaluation of Amplicor Mycobacterium tuberculosis PCR Test as a Screening Method in a Low-Prevalence Population // Clinical Microbiology. Aug. 1996. p. 2001-2003.