

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АТИПИЧНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ СВИНЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

СМОЛЯНИНОВ Юрий Иванович, *Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН*

ВОЛКОВ Дмитрий Владимирович, *Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН*

ДОНЧЕНКО Николай Александрович, *Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН*

*При исследовании биоматериала от реагирующих на туберкулины свиней изолированы 58 культур кислотоустойчивых микобактерий, или 7,5 % от количества исследованных проб. Частота изоляции культур из биоматериала от кур составила 12,5 %, от синантропных птиц – 7,5 %, из проб объектов внешней среды – 9,4 %. По результатам изучения культуральных, морфологических и биохимических свойств в организме свиней, реагирующих на ППД-туберкулины для млекопитающих и птиц, и внешней среде благополучных по туберкулезу свиноводческих хозяйств Новосибирской области персистируют 6 самостоятельных видов атипичных микобактерий 2–4-й групп классификации по Раньону, включая *M. xenopi*, *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. phlei* и *M. scrofulaceum*. Наибольшее количество полевых изолятов как из биоматериала от свиней, так и проб внешней среды представлено микобактериями комплекса *avium-intracellulare*, что свидетельствует об их широком распространении. Из проб объектов внешней среды как основных источников распространения микобактериозов у свиней изолированы и идентифицированы 28 культур различных видов атипичных микобактерий также с превалированием культур комплекса *avium-intracellulare*.*

Введение. Сдерживающий фактор успешного развития свиноводства – многочисленные инфекционные болезни животных. Несмотря на то, что туберкулез свиней в России почти не регистрируется, актуальной остается проблема микобактериозов, распространенных повсеместно. Микобактериоз, обусловленный заражением свиней атипичными микобактериями, при патолого-анатомическом исследовании паренхиматозных органов и лимфатических узлов практически не отличим от туберкулеза, что вносит неясность в истинную эпизоотическую ситуацию.

Цель работы – индикация микобактерий из биоматериала от свиней, реагирующих на ППД-туберкулины для млекопитающих и птиц, а также объектов внешней среды, изучение их культуральных и биохимических свойств и видового состава.

Методика исследований. Комплексному бактериологическому исследованию был подвергнут биоматериал от убитых на мясоперерабатывающих предприятиях и реагирующих на ППД-туберкулины для млекопитающих и для птиц свиней, кур подсобных хозяйств, синантропных птиц (голуби, воробьи), отстрелянных на территории хозяйств, и проб внешней среды. Всего 1207 проб.

Биоматериал обрабатывали по методу Гона-Левенштейна-Сумиоши и культивировали на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена при температуре 37 °С. Кислото- и спиртоустойчивость микобактерий определяли в мазках при окраске по Цилю-Нильсену [1, 6].

Культуральные свойства изолированных из биоматериала от свиней и проб объектов внешней среды определяли у 95 культур микобактерий. Бактериальную взвесь готовили из расчета 1 мг бактериальной массы в 1 мл физиологического раствора по стандарту мутности штамма микобактерий VCG.

Групповую классификацию микобактерий проводили по методу Раньона [9]. Классификация основана на способности образовывать пигмент при культивировании отдельными видами микобактерий [8], скорости роста [7] и росте при различных температурах (22, 37, 45 и 52 °С).

Биохимические свойства определяли по комплексу дифференциально-диагностических тестов, позволяющих установить видовую принадлежность изолированных культур микобактерий [2–5].

Результаты исследований. При исследовании биоматериала от реагирующих на туберкулины свиней изолированы 58 культур кислотоустойчивых микобактерий, или 7,5 % от количества исследованных проб (табл. 1). Частота изоляции культур из биоматериала от кур составила 12,5 %, от синантропных птиц – 7,5 %, из проб объектов внешней среды – 9,4 %.

По объектам внешней среды чаще культуры микобактерий изолировали из проб навозных желобов (18,7 %); опилок, используемых в качестве подстилки (15,4 %) и комбикорма (13,3 %). В целом из биоматериала от свиней, птиц и проб внешней среды изолированы 106 культур микобактерий.





Таблица 1

Частота изоляции микобактерий из биоматериала от свиней, птиц и проб внешней среды свиноводческих хозяйств Новосибирской области

Объект бактериологического исследования	Исследовано проб	Изолировано культур	
		количество	%
Биоматериал от свиней	786	58	7,5
Биоматериал от кур	56	7	12,5
Биоматериал от синантропных птиц	120	18	15,0
Пробы внешней среды, всего	245	23	9,4
В том числе:			
вода	52	2	3,8
помет синантропных птиц	40	3	7,5
почва	21	2	9,5
навозные желоба (навоз)	16	3	18,7
опилки	13	2	15,4
кормушки	42	4	9,5
полы и проходы	46	5	10,9
комбикорм	15	2	13,3
Всего	1207	106	8,8

Культуральные свойства. Скотохромогенность (образование пигмента на свету) установлена у 37 или у 38,9 % изолированных культур микобактерий. Цвет колоний варьировал от желтого до желто-оранжевого. Нефотохромогенные (не образующие пигмент на свету), относящиеся к 3-й группе классификации по Раньону, составили 58 культур (61,1 %).

По скорости роста 29 культур (30,5 %) были отнесены к быстрорастущим, появление колоний у которых установлено в период до 7 сут. культивирования. Остальные 66 культур отнесены к медленно растущим (рост позднее 7 сут.). Некоторые культуры, обладающие медленным ростом (до 7 сут.), классифицировались как нефотохромогенные (непигментные) и отнесены к 3-й группе по классификации Раньона.

Из 95 культур микобактерий 91 (95,8 %) дали выраженный рост колоний при температуре 37 °С, 25 культур (26,3 %) показали рост при температуре 25 °С, причем все они росли и при 37 °С. При температуре 45 °С рост зарегистрирован у 27 культур (28,4 %), которые росли также при температуре 37 °С. Одна быстрорастущая

культура росла как при температуре 37 °С, так и при 52 °С, однако не проявляла ростовых свойств при температуре 25 °С. Эта особенность позволила сразу классифицировать ее как *M. phlei*.

Биохимические свойства. При исследовании 95 изолированных культур микобактерий выявлено, что все они дали рост колоний на среде Левенштейна-Йенсена в реакции с салицилатом натрия и четко классифицировались как атипичные (табл. 2). В реакции активности каталазы 37 культур микобактерий (39 %) дифференцированы как *M. avium-intracellulare*. В реакции термостабильности каталазы все культуры показали отрицательный результат.

В реакции гидролиза Твин-80 восемь культур дифференцировали как *M. scrofulaceum* и 37 как комплекс *M. avium-intracellulare*. Всего в данном тесте идентифицированы 45 культур микобактерий.

В реакции осаждения лимонно-аммиачного железа три полевые культуры дифференцированы как *M. phley* (4-я группа по Раньону), у которых при культивировании проявилось окрашивание в коричневатый цвет. При этом две культуры были изолированы из биоматериала от свиней и 1 от голубя.

Реакция толерантности к хлориду натрия показала полное ингибирование роста у 66 культур микобактерий на среде Левенштейна-Йенсена, что позволило дополнительно отнести их к медленно растущим. У 29 культур наблюдали рост при добавлении в среду хлорида натрия (быстрорастущие).

По формамидазной активности положительную реакцию проявили 26 культур микобактерий 4-й группы по Раньону, включая виды *M. smegmatis* (15 культур), *M. phlei* (3 культуры) и *M. scrofulaceum* (8 культур), изолированных как из биоматериала от свиней и птиц, так и проб внешней среды.

В диагностическом тесте редукции теллурита калия 69 культур дополнительно были отнесены к 3-й и 4-й группам по Раньону и 3 – ко 2-й группе.

По результатам культурально-морфологических и биохимических свойств идентифицированы 6 самостоятельных видов атипичных микобактерий, персистирующих в организме свиней и внешней среде свиноводческих хозяйств: *M. xenopi*, *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. phlei* и *M. scrofulaceum* (табл. 3).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о повсеместном распространении атипич-

Таблица 2

Биохимические свойства изолированных культур атипичных микобактерий

Диагностический тест	Метод (автор теста)	Положительная реакция, культур	
		количество	%
Рост на среде с салициловым натрием	Tsukamura M.	95	100,0
Активность каталазы	Wayne L.	37	38,9
Термостабильность каталазы	Cubica J., Pool G.	–	–
Гидролиз Твин-80	Wayne L.	45	47,4
Осаждение лимонно-аммиачного железа	Szabo I., Vandra E.	3	4,6
Формамидазная активность	Nagayama H. et al.	26	27,4
Редукция теллурита калия	Kilburn J. et al.	69	95,8
Толерантность к хлориду натрия	Kestle D. et al.	66	69,5

Видовой состав атипичных микобактерий, изолированных из биоматериала от свиней и проб внешней среды

Вид микобактерий	Группа по Раньону	Изолировано культур микобактерий			
		свиньи	синантропные птицы	внешняя среда	всего
<i>M. xenopi</i>	2	2	–	1	3
<i>M. avium-intracellulare</i>	3	23	4	10	37
<i>M. fortuitum</i>	3	5	1	–	6
<i>M. smegmatis</i>	4	8	5	2	15
<i>M. phlei</i>	4	2	1	–	3
<i>M. scrofulaceum</i>	4	4	–	4	8
Всего	–	44	11	17	72
Не идентифицированы	2-4	14	7	2	23
Итого		58	18	19	95

ных микобактерий во внешней среде и их роли как основных источников в заражении свиней микобактериозами.

Результаты комплексных бактериологических исследований, а также изучения тинкториальных, культурально-морфологических и биохимических свойств позволили определить групповую и видовую принадлежность 72 культур атипичных микобактерий из 95 анализируемых, изолированных из биоматериала от свиней и проб внешней среды свиноводческих хозяйств Новосибирской области. При идентификации культуры микобактерий отнесены к 6 видам 2, 3 и 4-й групп по классификации Раньона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ГОСТ 26072-89 (СТСЭВ 3457-81). Животные и птица сельскохозяйственные. – М., 1989. – Режим доступа: <http://kodeks.karelia.ru>.
- Зыков М.П., Ильина Т.Б. Потенциально-патогенные микобактерии и лабораторная диагностика микобактериозов. – М., 1978. – 161 с.
- Кадочкин А.М. Дифференциация и идентификация микобактерий // Ветеринария. – 1984. – № 9. – С. 62–64.
- Макаревич Н.М., Дорожкова И.Р. Пути совершенствования современных методов лабораторной диагностики туберкулеза // Бюл.: ВИЭВ. – 1983. – Вып. 51. – С. 24–28.
- Методические наставления по проведению исследований при микобактериозах животных / М.И. Гулюкин [и др.]. – М., 2012. – 85 с.
- Наставление по диагностике туберкулеза животных. Утв. Департаментом ветеринарии МСХ РФ. – М., 2002. – 63 с.

7. Kappler W. Klassifizierung und Identifizierung von Jansan Waehsenden atypischen Mycobacterien // Z. Tu-berk, 1968, Jg. 127, S. 31–35.

8. Kubica G. et al. Numerical Taxonomy of Selected. Slowly Growing Mycobacteria // J. gen. Microbiol, 1973, Vol. 74, P. 159–167.

9. Runyon E. Anonymous mycobacteria in pulmonary diseases // Med. Clin. N. Amer, 1959, Vol. 43, No. 1, P. 273–290.

Смолянинов Юрий Иванович, д-р вет. наук, проф., главный научный сотрудник, Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН, Россия.

Волков Дмитрий Владимирович, младший научный сотрудник, Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН, Россия.

Донченко Николай Александрович, д-р вет. наук, руководитель, Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН, Россия. 630501, Новосибирская обл., пос. Краснообск. Тел.: (383) 348-04-95; e-mail: Tbc2009@yandex.ru.

Ключевые слова: микобактериоз свиней; атипичные микобактерии; биоматериал; культуральные и биохимические свойства; индикация; идентификация; биопроба; внешняя среда.

CULTURAL AND MORPHOLOGICAL PROPERTIES ATYPICAL MYCOBACTERIA ISOLATED FROM PIGS ON THE TERRITORY OF THE NOVOSIBIRSK REGION

Smolyaninov Yuri Ivanovich, Doctor of Veterinarian Sciences, Professor, Chief Researcher, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFSCA RAS, Russia.

Volkov Dmitry Vladimirovich, Junior Researcher, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFSCA RAS, Russia.

Donchenko Nikolay Alexandrovich, Doctor of Veterinarian Sciences, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFSCA RAS, Russia.

Keywords: mycobacteriosis in pigs; atypical mycobacteria; biomaterial; culture and biochemical properties; indication; identification; biological sample; external environment.

When examining biomaterial from tuberculin-reacting pigs, we have isolated 58 cultures of acid-fast mycobacteria, or 7.5 percent of the number of samples studied. The rate of cultures isolation from hen biomate-

rial amounted to 12.5 percent, from synanthropic birds 7.5 percent, from environmental samples 9.4 percent. Resulting from cultural, biochemical and morphological studies, 6 species of atypical mycobacteria were found to persist in the organism of pigs, reacting to avian and mammalian PPD complexes, and in the environment of tuberculosis-free pig-producing farms in Novosibirsk Region. These mycobacteria species belong to 2–4 groups according to the Runyon's classification, and include *M. xenopi*, *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, and *M. scrofulaceum*. Major field isolates from both pig biomaterial and the environment are represented by *M. avium-intracellulare* complex that indicates their wide distribution. From the samples of various environmental objects, being main sources of mycobacterioses in pigs, were isolated and identified 28 cultures of different species of atypical mycobacteria with *M. avium-intracellulare* complex prevailed.

