



На правах рукописи

Слинина Клавдия Николаевна

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗА  
И НОКАРДИОФОРМНЫХ АКТИНОМИЦЕТНЫХ ИНФЕКЦИЙ**  
(эпизоотология, диагностика, профилактика)

Специальности:

- 16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология;
- 16.00.02 – патология, онкология и морфология животных

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора ветеринарных наук

Иваново - 2009

14 МАЯ 2009

Работа выполнена в лаборатории инфекционных и инвазионных болезней сельскохозяйственных животных ГНУ Научно-исследовательского ветеринарного института Нечерноземной зоны РФ Российской академии сельскохозяйственных наук, в хозяйствах Нижегородской, Рязанской, Орловской областей, в ГУЗ НО областном и городском противотуберкулёзных диспансерах Нижнего Новгорода

**Официальные оппоненты:**

заслуженный деятель науки РФ,  
доктор ветеринарных наук,  
профессор  
**Овдиенко Николай Павлович**

доктор ветеринарных наук,  
**Кувшинов Вадим Леонидович**

доктор ветеринарных наук,  
профессор  
**Молев Аркадий Иванович**

**Ведущая организация:** ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана».

Защита состоится « 9 » июня 2009 г. в 10<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д. 220.029.01 в ФГОУ ВПО «Ивановская государственная сельскохозяйственная академия имени академика Д.К. Беляева» С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Ивановская ГСХА имени академика Д.К. Беляева. Адрес: 153012, г. Иваново, ул. Советская, 45.

Автореферат разослан « 5 » мая 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доцент

 С.В. Егоров

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Туберкулёз является антропозоонозом, поэтому представляет мировую проблему, несмотря на значительные успехи, достигнутые в различных научных и практических сферах. На современном этапе борьбы с туберкулёзом животных основой профилактических и оздоровительных мероприятий является диагностика этой болезни. Для прижизненной диагностики туберкулёза сельскохозяйственных животных в данное время основным, массовым методом в ветеринарной практике является внутрикожная туберкулиновая проба с применением ППД для млекопитающих. Однако нередким является наличие положительно реагирующих на туберкулин животных в благополучных по туберкулёзу хозяйствах – это так называемые неспецифические или парааллергические реакции на туберкулин. Актуальность этой проблемы увеличивается из года в год; так в настоящее время в благополучных хозяйствах выявляется в 5,3 раза больше реагирующих животных, чем в неблагополучных по туберкулёзу хозяйствах [А.Х. Найманов, Н.П. Овдиенко, 2003]. Массовые выявления неспецифических реакций на туберкулин приводят к убою большого количества реагирующих здоровых животных, что увеличивает размеры экономического ущерба и вызывает обоснованные сомнения в правильности диагностики туберкулёза. Известно, что причиной неспецифических реакций на туберкулин у скота являются не только микобактерии туберкулёза, но и многие условно-патогенные и сапрофитные микобактерии, нокардиоформные актиномицеты и коринебактерии, имеющие общие с микобактериями туберкулёза антигены. Некоторые виды или штаммы микроорганизмов могут вызывать у скота поражения, сходные с туберкулёзными, что значительно усугубляет проблему.

Значение этих микроорганизмов в патологии скота не однозначно. Многие виды и штаммы вызывают лишь сенсibilизацию скота к туберкулину, не вызывая видимых изменений в тканях и органах, но ряд медленно растущих микобактерий (например *M.kansasii*, *M.avium*) могут вызывать поражения весьма сходные с туберкулёзными.

Особенное значение в патологии свиней, лошадей и крупного рогатого скота могут играть нокардиоформные актиномицеты. Некоторые штаммы в результате пассажей на животных приобретают вирулентность и вызывают у новорождённых животных остро протекающие заболевания с летальным исходом [А.Л. Лазовская, К.Н. Слина, З.Г. Воробьёва, 2001, 2004, 2006].

Несомненно, требуется совершенствование бактериологической диагностики туберкулёза, микобактериозов и нокардиоформных актиномикозов с применением новейших достижений биохимии и молекулярной биологии, обеспечивающих экспресс-идентификацию бактерий всех уровней таксономической иерархии: род, вид, штамм [Л.М. Пинчук, А.Л. Лазовская, 1989; О.А. Нестеренко, 1985; Т.Ф. Оттен, 2003].

Всё вышеизложенное определило выбор темы и направление наших исследований.

**Цель и задачи исследований.** Целью настоящего исследования явилось усовершенствование методов диагностики туберкулёза, микобактериозов и нокардиоформных актиномицетных инфекций при возникновении положительных туберкулиновых реакций на основе разработанного латексного антигенного диагностикума, на разработанных новых питательных средах с применением различных методов идентификации и предпосевной деконтаминации патологического материала, нового способа обеззараживания животноводческих помещений. Исходя из поставленной цели, были определены следующие задачи:

- выяснить роль микобактерий и нокардиоформных актиномицетов у положительно реагирующих на туберкулин животных;
- разработать латексный антигенный диагностикум (ЛТА) для выявления противотуберкулезных антител;
- выяснить роль родококков и коринебактерий в патологии животных;
- изучить культурально-биохимические, биологические, хемотаксономические и серологические свойства микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий, выделенных от положительно реагирующих животных на туберкулин;
- разработать новые питательные среды для идентификации микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий;
- разработать новый поливалентный дезинфектант и способы его применения для деконтаминации патологического материала и дезинфекции животноводческих помещений;
- разработать новый, простой и дешёвый способ консервации культур микроорганизмов, позволяющий длительное время сохранять их биологические свойства.

**Научная новизна.** В настоящей работе показано значение микобактерий, родококков и коринебактерий в патологии свиней и крупного рогатого скота, вызывающих не только положительные туберкулиновые реакции и ограниченные поражения лимфатических узлов и тканей у взрослого поголовья, но и тяжёлые заболевания молодняка часто с летальным исходом (до 50%);

- разработан антигенный диагностикум (ЛТА) для выявления противотуберкулёзных антител;
- установлена роль родококков и коринебактерий в появлении положительных туберкулиновых реакций у животных;
- показана роль родококков и коринебактерий в патологии животных;
- определены культурально-биохимические, биологические, хемотаксономические и серологические свойства родококков и коринебактерий, вы-

деленных от положительно реагирующих на туберкулин сельскохозяйственных животных, причем родококки отнесены к виду *Rhodococcus equi*, а коринебактерии к виду *Corynebacterium pseudotuberculosis*;

- на территории Российской Федерации от положительно реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота с туберкулёзноподобными изменениями в органах выявлена культура медленнорастущего условно-патогенного вида *M. хепорі*;

- показано значение хемотаксономических исследований на основе жирнокислотного состава клеток с применением газового хроматографа для родовой и видовой идентификации микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий;

- разработаны новые агаровые питательные среды для идентификации микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий на основе гумивита, желтка и агара оптимальные для исследования ферментативных свойств, жирнокислотного состава клеток и выделения культур из патологического материала;

- разработан новый поливалентный дезинфектант для деконтаминации патологического материала от положительно реагирующего на туберкулин скота и больных туберкулёзом людей;

- разработан новый способ деконтаминации патологического материала, позволяющий повысить выделение и скорость роста микобактерий и нокардиоформных актиномицетов;

- обработка биоматериала с использованием 0,3% раствора препарата «Лесептик» при экспозиции 24 часа либо 0,5% раствора при экспозиции 3 часа позволяет выявлять нокардиоформные актиномицеты и микобактерии на 20-30% больше, чем при традиционной обработке 6% - ным раствором серной кислоты;

- разработан эффективный способ применения препарата «Лесептик» для дезинфекции животноводческих помещений в составе 10% -ной гашёной извести, приготовленной на 1% растворе «Лесептик» и в виде 0,7-1,0% раствора для обработки обуви в дезинфекционных ваннах;

- разработан новый простой и дешёвый способ консервации культур микроорганизмов, позволяющий длительное время сохранять их биологические свойства.

Новизна научных исследований подтверждена 12 патентами Российской Федерации.

**Практическая значимость.** Результаты исследования могут быть применены в работе практических и научно-исследовательских лабораторий, использованы для бактериологической, серологической диагностики, туберкулёза и нокардиоформных актиномицетов, в работе эпизоотологических и эпидемиологических служб при разработке профилактических мероприятий, а так же при создании мониторингов этих инфекций. Лабораторное исследование биоматериала от сельскохозяйственных животных на основе нового способа деконтаминации и культивирования на новых питательных средах

сокращает сроки выращивания и повышает частоту выделения микобактерий и нокардиоформных актиномицетов, что позволяет ускорить диагностику и повысить эффективность санитарно-гигиенических мероприятий.

Рекомендованные меры по профилактике туберкулёза и нокардиоформных актиномицетов (смена корма, способ применения дезинфицирующего препарата «Лесептик», лабораторные исследования с новыми средами и способами деконтаминации посевного материала) позволили исключить возникновение положительных туберкулиновых реакций у животных.

Научные разработки автора вошли в следующие нормативные документы:

1. **Технические условия** на «Набор для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в реакции агглютинации латекса РАЛ» (ТУ 9388-001-0067433-99 Утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ, 1999).

2. **Наставление** по применению набора для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в реакции агглютинации латекса (РАЛ) (Утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ, 1999).

3. **Методические рекомендации** по серологической диагностике туберкулеза сельскохозяйственных животных (Утверждены РАСХН, Москва, 1999).

4. **Методические рекомендации** / Новые методы исследования возбудителей антропоозоонозов. Туберкулёз (Утверждены РАСХН, Москва, 2003.)

5. **Временное наставление** по применению дезинфицирующего средства «Лесептик» (Утверждено Комитетом Госветнадзора администрации Нижегородской области, Н.Новгород, 2001).

**Внедрение результатов исследований.** Научные разработки автора используются в сельскохозяйственных предприятиях Российской Федерации (Рязанской, Нижегородской, Орловской областей, в Республике Саха (Якутия), ГУЗ НО областного и городского противотуберкулёзных диспансеров Нижнего Новгорода.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены и одобрены на: международной конференции «Профилактика диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных» (Ульяновск, 2006); симпозиуме в НИИ по изучению лепры «Иммунодиагностика и иммунореабилитация при лепре, туберкулёзе и других хронических заболеваниях» (Астрахань, 1998); Всероссийской научно-практической конференции: Сельскохозяйственная наука Республика Мордовия (Саранск, 2005); конференции ведущих учёных России, СНГ и др. стран «Научные основы профилактики и лечения болезней животных» в Уральском НИВИ, (Екатеринбург, 2005); научной конференции, посвящённой 85-летию академика РАМН И.Н. Блохиной «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний» (Нижний Новгород, 2006); научно-

практической конференции «Новые технологии в повышении сохранности с.-х. животных» (Нижний Новгород.- 2007, 2008).

**Публикации:** Основные научные положения диссертации изложены в 43 научных работах, в том числе 20 работ опубликованы в изданиях, регламентированных ВАК РФ для докторских диссертаций, которые отражают основное содержание диссертации. Материалы диссертации защищены 12 патентами РФ.

**Личный вклад соискателя.** Представленная диссертационная работа является результатом 13-летних научных исследований автора. Изучение патологоморфологических, биологических, серологических исследований патологического материала, разработка дезинфектанта, способов деконтаминации патологического материала, выделение культур микобактерий и нокардиоформных актиномицетов, изучение биологических и серологических свойств, способов дезинфекции животноводческих помещений, выполнены лично Слининой К.Н. По материалам собственных исследований диссертантом лично и в соавторстве с Лазовской А.Л., Воробьёвой З.Г. опубликовано 43 научные работы в том числе, 20 работ в изданиях, регламентированных ВАК РФ для докторских диссертаций. Соавторы опубликованных научных статей и проводимых научных работ по теме диссертации подтверждают отсутствие заимствования их данных со стороны Слининой К.Н. (справки от А.Л. Лазовской и З.Г. Воробьёвой представлены в диссертационный совет).

Выражаем искреннюю благодарность доктору медицинских наук, профессору Лазовской Алле Леоновне, доктору биологических наук Воробьёвой Зое Глебовне за научные консультации и помощь при планировании, выполнении и анализе полученных результатов данной работы. Выражаем искреннюю благодарность за помощь в организации и выполнении данной работы директору ГНУ научно-исследовательского ветеринарного института Нечернозёмной зоны РФ доктору ветеринарных наук, профессору, член-корреспонденту РАСХН П.Н. Сисягину, зам директора по научной работе З.Я. Косорлуковой,

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

- представитель нокардиоформных актиномицетов *Rhodococcus equi*, а так же *Corynebacterium pseudotuberculosis* являются причиной положительных туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота и свиней;
- роль родококков и коринебактерии в патологии животных;
- антигенный диагностикум (ЛТА) для прижизненной диагностики туберкулёза в реакции агглютинации латекса (РАЛ);
- культурально-биохимические, биологические, хемотаксономические и серологические свойства микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий.

- роль *M. херорі* в возникновении патологоанатомических изменений сходных с туберкулёзом;
- новые питательные среды на основе гумивита и агара в идентификации микобактерий и нокардиоформных актиномицетов;
- новый поливалентный дезинфектант «Лесептик» для предпосевной деконтаминации патологического материала от положительно реагирующих на туберкулин сельскохозяйственных животных и больных туберкулёзом людей;
- новый способ применения дезинфектанта «Лесептик» для дезинфекции животноводческих помещений в составе 10% гашёной извести, приготовленной на 1% растворе препарата и в виде 0,7-1,0% раствора для обработки обуви в дезинфекционных ваннах;
- новый способ консервации для длительного хранения микроорганизмов.

**Объём и структура диссертации.** Диссертация изложена на 250 страницах компьютерного текста, содержит разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, заключения, выводов, практических предложений, списка литературы и приложения. Работа включает 40 таблиц и 12 рисунков, 476 источников литературы, в т. ч. 345 отечественных и 131 зарубежных авторов.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Работа выполнена в 1995-2008 гг. в рамках федеральной программы фундаментальных прикладных исследований в отделе инфекционных и инвазионных болезней сельскохозяйственных животных в ГНУ Научно-исследовательского ветеринарного института Нечернозёмной зоны РФ Российской академии сельскохозяйственных наук, в хозяйствах Нижегородской, Рязанской, Орловской областей, в ГУЗ НО областном и городском туберкулёзных диспансерах Н.Новгорода.

Патологический материал получали от животных из ОАО «Ильиногорское», совхоза «Горьковский» и «Держинский» Нижегородской области, из 8 хозяйств Рязанской области и ОАО «Знаменский» Орловской области.

Патологоанатомические исследования проводили в хозяйствах при убое и падеже животных. Отбирали образцы материала: лимфатические узлы, кусочки органов: лёгких, печени, сердца, почек, стенок кишечника, мышцы шейные и ягодичные, а также пробы кормов из различных серий для бактериологических исследований, посевов и заражения лабораторных животных.

Патологический материал и образцы кормов для посева обрабатывали по методике А.П.Аликаевой – 5-6%-ным раствором серной кислоты, высева-



ли на плотные питательные среды Левенштейна-Иенсена и Финн-2, выращивали при температуре 25, 37, 42, 52 ° С. Из выросших через 3-45 дней колоний S- и R- формы делали мазки и окрашивали по Цилю-Нильсену и по Бою, а по мере необходимости по Грамму и Романовскому-Гимза (Рекомендации, Омск-1988; Справочник, Москва, «Колос» 1981).

### **Изучаемые культуры бактерий, микобактерий и нокардиоформных актиноидетов**

*M. bovis* - штаммы Vallee, BCG, Ravenal, Виноградов (ГИСК имени Л. Тарасевича)

*M. bovis* – свежевыделенные штаммы (n = 20)

*M. tuberculosis* штаммы Academia, H37Ra, H37Rv (ГИСК им. Тарасевича)

*M. avium* штаммы ГИСК, № 214 (ГИСК им. Л. Тарасевича)

*M. avium*- свежевыделенные штаммы (n=12)

*M. smegmatis* № 7 (ГИСК им. Л. Тарасевича)

*Nocardia asteroides* (ГИСК им. Л. Тарасевича)

*M. fortuitum* (ГИСК им Л. Тарасевича)

*M. flavescens*– свежевыделенные штаммы (n=2)

*Rhodococcus equi* – свежевыделенные штаммы (n= 18)

*Corynebacterium pseudotuberculosis* – свежевыделенные штаммы (n = 4)

В экспериментах использовали так же штаммы микроорганизмов, полученные из ГИСК имени Л. Тарасевича (Москва): *Proteus mirabilis* №237, *Proteus vulgaris* №177, *Shigella flexneri* № 170, № 337, *Shigella sonnae* № 5063, № 2802, *Salmonella typhimurium* № 111, *Escherichia coli* M-17, *Penicillium chrysogenum*, *Pseudomonas aeruginosa* № 28, *Enterobacter faecalis* № 4, а также штаммы, полученные нами при посевах патологического материала от свиной свинокмплекса ОАО «Ильиногорское»: *Escherichia coli* (n=11), *E. vulgaris* (n=2), *Salmonella sp.p.* (n=5), *Staphylococcus aureus* (n=3).

### **Исследование на лабораторных животных**

Исследование осуществляли на мышах беспородных (обоего пола) массой 19-20 г (n=50), морских свинках (обоего пола) массой 250-300 г (n=15), кроликах (обоего пола) массой 2,0-2,5 кг (n=6). На новорожденных поросятах массой 350-500 г (n=6). Лабораторных животных: кроликов, морских свинок и белых мышей, а так же трёхдневных поросят заражали как непосредственно патологическим материалом от животных, так и бактериальной массой культур, выросших на средах. Все опытные культуры для заражения животных брали после 3-5-го пассажа с плотных яичных сред. Токсичность родококков и коринебактерий изучали на новорожденных поросятах, заражая их интраназально в дозе 0,3 мл суспензии, содержащей ≈ 500 млн. микробных тел в 1 мл.

При выполнении экспериментов на животных руководствовались «Правилами гуманного обращения с лабораторными животными», 2003.

### **Культурально-биохимические и хемотаксономические исследования**

Исследовали скорость роста штаммов свежeweыделенных микобактерий, родококков и коринебактерий, оптимальный рост при различных температурах: 25, 37, 42, 45, 52 ° С. Рост на различных дифференциальных средах: на плотной яичной среде с салицилатом Na, с 5% хлористым натрием, с  $\text{NaNO}_3$ , с теллуридом калия. Ферментативные свойства 18 свежeweыделенных штаммов родококков и 4-х штаммов коринебактерий изучали с помощью систем индикаторных бумажных (СИБ) – производство фирмы «ИмБио» Н.Новгород (1978, 1993). Определяли уреазную и  $\beta$ -галактозидазную активность, а так же ферментацию сахаров, спиртов, аминокислот ( лактоза, сахароза, сорбит, инозит, маноза, арабиноза, глюкоза, лизин, аргинин, фенилаланин, орнитин, маннит, цитрат натрия, малонат натрия) согласно «Методическим рекомендациям по стандартизации методов идентификации бактерий с применением систем индикаторных бумажных (СИБ)» 1988 г.

Хемотаксономические особенности жирнокислотного состава клеток изучали методом сопиrolитической газожиdкостной хроматографии на газовом хроматографе марки «Цвет-500». Для газохроматографического определения жирнокислотного состава клеток микобактерий и нокардиоформных актиномицетов проводили гидролиз липидов и метилирование жирных кислот, используя непосредственно бактериальную массу, что значительно упрощает и ускоряет анализ. Метод заключается в приготовлении метиловых эфиров жирных кислот с помощью гидроокиси тетраметиламония (ГТМА), предложенный Мак Ги и модифицированный Л.В.Андреевым и А.Н. Склифасовским. Метод осуществляется без предварительной экстракции липидов из бактериальной массы. 5-10 мг помещают в ампулу, добавляют несколько капель (0,1-0,2 мл) 7% раствора ГТМА в 80% водном метаноле. Запаянные ампулы прогревают при 120-130°С в течение 15-20 мин. в результате проба приобретает вид прозрачного или опалесцирующего раствора 2-3 мкл анализируемого материала вводят микрошприцом в испаритель газового хроматографа, где при высокой температуре происходит метилирование жирных кислот. Площади пиков на хроматограммах определяют с помощью интегратора или, умножая высоту пика на ширину на половине высоты, вычисляя затем процент от общей площади пиков. Использование состава клеточных кислот позволяет проводить видовую идентификацию культуры в течение 2-3 часов после её выращивания, учитывая некоторые дополнительные признаки: скорость роста, пигментацию. Для анализа требуется небольшое количество бактериальной массы, возраст культуры не отражается на результатах (Методические рекомендации, 1993).

Определение чувствительности штаммов к антибиотикам изучали диск-диффузионным методом в соответствии с Методическими указаниями с использованием стандартного набора антибиотиков (НИЦФ Москва, Санкт-Петербург).

**Серологические исследования.** Сыворотки крови от положительно реагировавших на туберкулин животных изучали на наличие антител к микобактериям с помощью латексного антигенного туберкулёзного диагностикума. Для приготовления антигена использовали штамм Vallee (*M.bovis*).

Наличие антигенов микобактерий в моче животных обнаруживали с помощью латексного антительного диагностикума.

Методики изготовления антигенного и антительного латексных диагностикумов, постановка реакции и учет результатов РАЛ отражены в разработанных нами «Методических рекомендациях по серологической диагностике туберкулёза сельскохозяйственных животных» (Утверждены Москва, 1999).

Наставление по применению набора для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в реакции агглютинации латекса (РАЛ) (Утверждены, Москва, 1999).

#### **Изучение бактерицидного действия препарата дезинфектанта «Лесептику»**

Для испытания бактерицидного действия исследуемых в работе дезинфектантов (формальдегид, каустик, лесептик) готовили их водные эмульсии или растворы в соответствующих концентрациях. Каждую концентрацию испытывали при экспозиции от 15 мин. до 24 часов. Густота суспензии микроорганизмов  $\approx 500$  млн. микробных тел в 1 мл. После окончания экспозиции культуру отмывали дважды изотоническим раствором хлорида натрия при центрифугировании, затем засевали каждый образец на 6 пробирок соответствующих сред. Родококки, коринебактерии и микобактерии засевали на среды Левенштейна-Иенсена и Финн-2, а остальные микроорганизмы на МПА, среду Эндо, солевой агар, висмут сульфитный агар, среду Сабуро и ставили в термостат при 37° С.

Контроль качества дезинфекции животноводческих помещений определяли по снижению обсеменённости микроорганизмами дезинфицируемых поверхностей (Инструкции, Агропромиздат 1989, 2002). Смывы брали до и после традиционной дезинфекции формальдегидом и раствором каустика в двух производственных помещениях свиноводческого комплекса и на двух фермах крупного рогатого скота. Отбор проб и посевы проводили в соответствии с действующей инструкцией, утверждённой Главным Управлением ветеринарии (1987).

Качество дезинфекции считалось удовлетворительным, если микробная обсеменённость снижена на 98-99%.

Полученные в процессе работы цифровые показатели анализировали биометрически с использованием критериев Стьюдента [В.Ю. Урбах, 1964; А.Т. Усович, П.Т. Лебедев, 1970], а также методами вариационной статистики по Е.К. Меркурьевой [1983].

## 2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.2.1. ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕТУБЕРКУЛЁЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ И НОКАРДИОФОРМНЫХ АКТИНОМИЦЕТОВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ ТУБЕРКУЛИНОВЫЕ РЕАКЦИИ У СВИНЕЙ И КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

#### 2.2.1.1. Родококковая инфекция у свиней в ОАО «Ильиногорское»

На свиноводческом комплексе ОАО «Ильиногорское» в Нижегородской области и в ОАО «Знаменский» Орловской области резко увеличился падеж молодняка в возрасте 5-12 недель в период 1995 – 2005 г.г. с наличием выраженных легочных и кишечных поражений. У павших поросят отъёмшей наблюдали явления бронхопневмонии и некротического энтероколита. У взрослого поголовья нередко наблюдались положительные туберкулиновые реакции, одинаково выраженные на туберкулины как из бычьих, так и из птичьих штаммов. Патологоанатомическая картина у взрослых животных характеризовалась наличием увеличенных лимфатических узлов (подчелюстных, заглоточных, брыжеечных) с абсцессами, окруженными фиброзной тканью, но без обызвествления, наполненными белым сметанообразным содержимым. В области шейных и ягодичных мышц наблюдали множественные абсцессы такого же характера. У отдельных животных единичные абсцессы наблюдали в легких. У вынужденно убитого молодняка в возрасте 5-12 недель обнаруживали гнойную бронхопневмонию с абсцессами, гнойный лимфаденит регионарных лимфатических узлов. Примерно у 50% павших поросят выявляли некротический энтероколит. В мазках из органов животных обнаруживали частично кислотоустойчивые полиморфные микроорганизмы, обычно располагающиеся внутриклеточно. Были сделаны посевы после предварительной обработки материала по методике А.П. Аликаевой из патологического материала от 51 головы взрослого поголовья свиней и 12 поросят 5-12 недельного возраста. Посевы были сделаны на среды Левенштейна-Иенсена и Финн-2 на 12 пробирок из каждого образца. Культура выростала во всех случаях в течение 7-14 дней от взрослого поголовья и от молодняка в виде слизистых желтых и светло-желтых колоний микроорганизмов без поверхностного мицелия. В мазках, окрашенных по Цилю-Нильсену обнаруживали кислотоустойчивые и некислотоустойчивые короткие палочки и кокки, а также синие ветвящиеся нити.

Периодически на комплексах возникала ситуация массовой гибели новорожденных поросят от диспепсии в возрасте 3-5 дней. На вскрытии обнаруживали увеличение регионарных лимфатических узлов, гиперемию и отек брыжейки, кишечник был пуст с небольшим содержимым слизи, желудок заполнен творожистой массой. В мазках из различных тканей выявляли немногочисленные кислотоустойчивые палочки и кокки. При посевах на плотные яичные питательные среды после деконтаминации патологического материала

ла от 15 поросят 3-5 дневного возраста обильно вырастали на 7-10 день желтоватые, гладкие, блестящие, слизистые колонии, при просмотре мазков были обнаружены синие и красные кокки и короткие палочки с фиолетовыми включениями. Были поставлены биологической пробы с выделенными от свиней и поросят культурами на 6 кроликах, 15 морских свинках и 30 мышках. Кролики, зараженные культурами быстрорастущих микроорганизмов, выделенными из патологического материала от взрослого свинополовья, хорошо прибавляли в весе, а при вскрытии не было обнаружено патологических изменений в органах. В мазках из органов кроликов также не было обнаружено кислотоустойчивых микроорганизмов. Посевы проб из органов кроликов на плотных питательных средах оставались стерильными в течение 2-3 месяцев наблюдения. При заражении морских свинок быстрорастущей культурой от свиней в мышцы бедра, выявляли у отдельных животных незначительное увеличение региональных паховых лимфоузлов, однако внутренние органы были без видимых изменений. В мазках из органов морских свинок (лимфоузлы, лёгкие) было выявлено незначительное количество частично кислотоустойчивых кокков.

В таблице 1 приводятся данные по заражению белых мышей *per os* 0,1мл использовали суспензию быстрорастущих кислотоустойчивых микроорганизмов, содержащей  $\approx 500$  млн. микробных тел в 1 мл. Использовали штаммы от взрослой свиноматки, от погибших новорожденных поросят и из кормов. Выраженной вирулентностью для мышей обладал только штамм № 12 от новорождённого поросёнка. Штамм № 12 вызвал поражение кишечника вплоть до гангрены, тогда как остальные два штамма вызывали ограниченные изменения селезенки и брыжейки.

В таблице 2 приводятся данные по интраназальному заражению новорожденных поросят культурой быстрорастущих кислотоустойчивых микроорганизмов (штамм № 12) от павшего трехдневного поросёнка. Подопытные поросята пали в течение 6 часов после заражения. При вскрытии был обнаружен отёк легких, что свидетельствует о значительной вирулентности (токсичности) штамма № 12. При посеве патологического материала от подопытных поросят на 8-15 день выросли светло-желтые блестящие, гладкие колонии культур. В мазках были обнаружены кислотоустойчивые палочки с темно-фиолетовыми включениями, синие и красные кокки.

На хроматограммах жирных кислот быстрорастущих культур из различных органов взрослых животных, а также из легких и кишечника молодняка обнаруживали картину, типичную для родококков: выраженный пик туберкулостеариновой кислоты, низкомолекулярные эфиры жирных кислот с числом углеродных атомов от 12 до 20 и отсутствие высокомолекулярных миколовых кислот, характерных для микобактерий.

Изучение культурально - биохимических свойств 18 штаммов родококков показало их неоднородность и группирование по признакам. Большое сходство имеют штаммы павших новорожденных поросят №12, 14, 15 и штамм № 13 от поросенка зараженного штаммом № 12, а также № 4 от взрослой свиньи. Отличаются друг от друга штаммы № 6 и № 7 и № 17 из

кормов. Штаммы от взрослых свиней № 2 и № 3 идентичны, но отличаются от штаммов № 1 и № 4. Штаммы от коровы и № 17 из корма сходны со штаммами от новорождённых поросят.

Исследование лекарственной устойчивости штаммов от взрослых свиней и молодняка выявило их чувствительность к рифампицину и стрептомицину и устойчивость к пяти другим противотуберкулезным препаратам. В то же время родококки из кормов были устойчивы только к двум противотуберкулезным препаратам. Лекарственная устойчивость изолятов родококков возникла как результат массированного применения на свиноводческом комплексе антибиотиков и других лекарственных препаратов.

Исследование мочи с латексным антительным диагностикумом у 120 свиней, положительно реагирующих на туберкулин, выявило наличие антигенов в титрах от 1:20 до 1:40(+).

Исследование сыворотки крови от положительно реагирующего на туберкулин взрослого поголовья (1275 голов) с латексным туберкулезным антигенным диагностикумом не выявило наличия противотуберкулезных антител в диагностических титрах. Однако субдиагностические титры 1:20 и 1:40 (+) свидетельствовали о наличии в сыворотках свиноматок антител к микроорганизмам родственными туберкулезным микобактериям.

Мы считаем, что по клинике и патологоанатомической картине заболевания, а также по морфологическим, культуральным, хемотаксономическим признакам выделяемых от свиней штаммов родококков их следует идентифицировать как *R. equi*.

В совхозе «Дзержинский» Нижегородской области наблюдалась ситуация сходная с «Ильиногорским» и «Знаменским» свиноводческим комплексом, выделенные культуры идентифицировали как *R. equi*.

### **2.2.1.2. Родококковая инфекция у крупного рогатого скота в совхозе «Горьковский»**

В совхозе «Горьковский» Нижегородской области провели изучение ситуации по возможному инфицированию положительно реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота микобактериями и нокардиоформными актиномицетами.

Исследовали сыворотки крови от 1200 голов на наличие антител к микобактериям бычьего вида. Были выявлены сыворотки крови с титрами антител 1:20 – 1:40 (+). Одновременно аллергическое исследование с туберкулином для млекопитающих выявило 26 животных с размером реакции 10-15мм. Исследование мочи на антигены микобактерий у 20 коров показало наличие АГ у трёх животных в титрах 1:20 – 1:40. Посевы на среды Левенштейна-Йенсена и Финн-2 патологического материала (легкие, печень, почки, лимфоузлы) позволили выявить в посевах (35 образцов) быстро выросшие нокардиоформные актиномицеты, идентифицированные нами как родококки. По культурально-биохимическим свойствам родококки были идентичны таковым от новорожденных поросят «Ильиногорского» комплекса. При пато-

Результаты заражения мышей культурой родококков per os

Происхождение культуры родококков	Количество мышей	Пало в течение 2-х дней	Клинические симптомы у мышей	Патологоанатомическая картина на 3 сутки опыта	Вес органов мышей (мг)	Патологоанатомическая картина у павших мышей	пл
Штамм № 5 из корма	8	–	Подвижные, активные, аппетит нормальный	Селезенка несколько увеличена, брыжейка гиперемирована	Легкие – 220, селезенка – 200, печень – 1300.		5 д и си
Штамм № 4 от взрослых свиней	8	–	Подвижные, аппетит снижен	Селезенка несколько увеличена, брыжейка гиперемирована	Легкие – 210, селезенка – 220, печень – 1970.		Рос в ма
Штамм №12 от павших новорожденных поросят	8	4	Мало подвижные, аппетит отсутствует	Селезенка увеличена, кишечник вздут, брыжейка гиперемирована	Легкие – 225, селезенка – 240, печень – 2380.	Кишечник сильно вздут, гиперемирован, гангрена 3 см кишечника, селезенка увеличена, брыжейка с кровоизлияниями	Ос де крас
Контроль	8	–	Подвижные, активные, аппетит нормальный	Все органы без изменений	Легкие – 200, селезенка – 190, печень – 1300.		

Результат заражения новорожденных поросят интраназально культурой родококков, штамм № 12 (5 пассаж на среде Левенштейна-Иенсена)

Количество поросят в опыте	Состояние животных	Кишечник	Легкие	Печень	Желудок	Сердце	Почки	Селезенка	Посев на среде Левенштейна-Иенсена	
									Скорость роста	Морф. колоний
Заражены 6 гол.	6 голов пало в течение 6 часов	без изменения	отёчные	желтого цвета с участками гиперемии	вздут	гиперемия верхушки сердца	корковый слой гиперемирован	незначительное увеличение и гиперемия	2 дня	обильный рост, мелкие непрозр. серовато-желтые колонии
Контроль 6 гол.	Живые 6 гол.	без видимых изменений							роста нет	



логоанатомических исследованиях убитых животных выявили увеличение лимфатических узлов различного расположения, а также в глубине мышц – абсцессы, наполненные светло-жёлтым полужидким содержимым. По своей структуре абсцессы были идентичны таковым у свиней «Ильиногорского» комплекса.

### **2.2.1.3. Родоккокки в кормах из комбикормового завода**

На основании вышеизложенного мы установили возможность инфицирования родоккокками свиней и крупного рогатого скота через корма алиментарным путём. Провели исследование 14 образцов кормов с комбикормового завода, который снабжает свиноводческий комплекс «Ильиногорское», совхозы «Горьковский» и «Дзержинский». Для этого использовали два метода предпосевной обработки кормов: 6%-ным раствором серной кислоты и 0,5%-ным раствором «Лесептик» [2, 5] с экспозицией 3 часа. Обработанный материал сеяли на среду Левенштейна-Йенсена и Финн-2 по 12 пробирок на каждую пробу. Через 2-8 дней в зависимости от способа деконтаминации материала отмечали рост колоний жёлтого цвета, слизистых, блестящих. При просмотре окрашенных мазков по Цилю-Нильсену выявляли неокислостойчивые или слабо кислотоустойчивые зернистые палочки, синие кокки, а также отдельные кислотоустойчивые клетки, сходные с выделенными из патологического материала от свиней и крупного рогатого скота. Исследование жирнокислотного состава клеток частично кислотоустойчивых культур газохроматографическим методом позволило отнести большую часть выделенных из кормов кислотоустойчивых культур к родоккоккам.

Один из штаммов из кормов по культурально - биохимическим свойствам и морфологии клеток был сходен со штаммами, вызывающими летальные заболевания у новорожденных поросят.

На основании проведённых исследований можно сделать вывод, что источником заражения животных хозяйств послужил корм, поставляемый с общего комбикормового завода [рис.1].

Пассирование родоккокков из кормов через организм новорождённых животных или молодняка привело к появлению высоковирулентных штаммов, вызывавших тяжёлые, часто с летальным исходом заболевания животных.

Таким образом, мы считаем, что наличие на свиноводческом комплексе «Ильиногорское» и в совхозах «Горьковский» и «Дзержинский» Нижегородской области и ОАО «Знаменский» Орловской области появление положительно реагирующих на туберкулин животных, связано в основном с родоккокковой инфекцией, что подтверждается следующими положениями:

- отсутствием у животных туберкулёза, вызванного *M. bovis*, а также микобактериоза вызванного условно-патогенными микобактериями;
- из органов положительно реагирующего взрослого скота, а так же павшего молодняка во всех случаях исследования образцов биоматериала

были выделены быстрорастущие частично кислотоустойчивые микроорганизмы;

- культурально - биохимические, морфологические, хемотаксономические исследования быстрорастущих частично кислотоустойчивых микроорганизмов позволили отнести их к родококкам, а по признакам вирулентности для животных – к *R. equi*;

- наличие у положительно реагирующих на туберкулин животных противотуберкулёзных антител в крови в достаточно высоких титрах и антигенов сходных с микобактериальными в моче свидетельствует об антигенном родстве микобактерий и родококков. Предполагается, что для возникновения родококкоза имеют значение как алиментарный, так и аэрогенный пути заражения животных. Особенно важным для исследований по эпизоотологии родококкоза является обнаружение различий в вирулентности родококков из окружающей среды и из организма больных животных. Мы осознаем, что безусловно на свиноводческом комбинате и в других хозяйствах происходит одновременное обсеменение животных и другими бактериями и вирусами, представителями «хлевой» микрофлоры, что усугубляет клиническую картину заболевания животных и не всегда представляется возможным выявить чётко этиологическую роль родококков и других нокардиоформных актиномицетов, однако определенные шаги в этом направлении видны и сделаны. Неудачная планировка цехов свиноводческих комплексов и системы аэрации, большое применение антибиотиков явились по нашему мнению также одной из причин появления вирулентности у родококков и возникновения родококкоза на комплексе.

### **2.2.1.4. Коринебактериоз у хряков в ОАО «Ильиногорское»**

В 2005 году в ОАО «Ильиногорское» для племенного разведения были завезены хряки из Омской области, которые на введение туберкулинов из бычьих и птичьих штаммов дали положительные реакции. Был проведен комиссионный убой дважды в 2005 г. – 3 головы и в 2006 г. – 3 головы и отобран материал для бактериологических посевов. В посеве из биоматериала после деконтаминации 0,5% раствором «Лесептика» с экспозицией 30 мин. и посева на среды Левенштейна-Иенсена и Финн-2 через 2-3-е суток обнаружен рост колоний желтого и белого цвета. При обработке материала по методике А.П. Аликаевой – роста колоний не было за 60 дней наблюдения. После окраски мазков по Цилю-Нильсену при микроскопии обнаружены короткие и длинные палочки синего цвета с розовыми включениями волютина.

При идентификации выделенных культур газохроматографическим методом изучен спектр жирных кислот штаммов. Анализ хроматограмм выявил отсутствие эфиров высокомолекулярных миколовых кислот с числом углеродных атомов более 20. Это свидетельствует о том, что культура не относится к микобактериям. Отсутствует туберкулостеариновая кислота С 19 разв.),

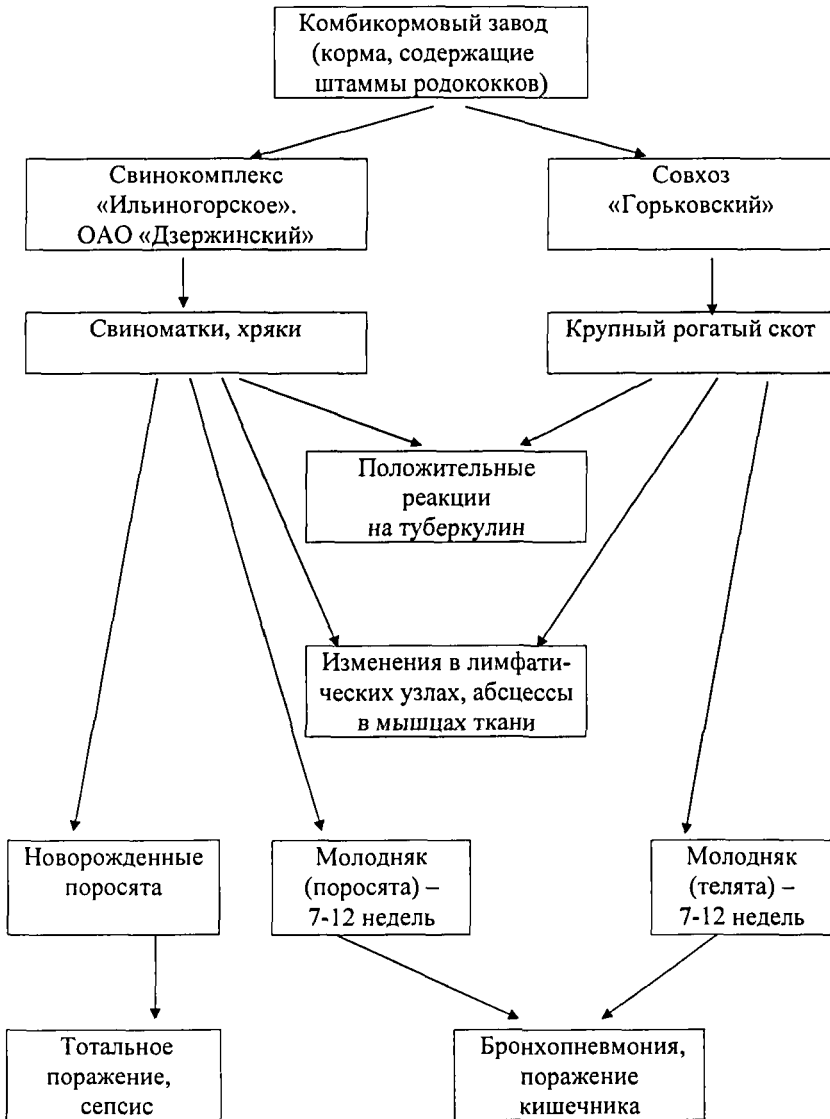


Рис.1. Распространение родококковой инфекции

которая обязательно присутствует у микобактерий и родококков. Наблюдается большое количество олеиновой кислоты (С18:1), что характерно для *Corynebacterium* и, с большей вероятностью, для *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Эти штаммы обладают сниженной патогенностью для свиней, у взрослых хряков обнаружены лишь ограниченные изменения в лимфоузлах и поражения шейных мышц в виде небольших абсцессов. Выделенные от хряков штаммы *C.pseudotuberculosis* обладали умеренной вирулентностью для белых мышей, вызывая их гибель в течение 20 дней (табл.3)

Культурально-биохимические свойства штаммов коринебактерий изучали с помощью систем индикаторных (СИБ). Результаты представлены в таблице 4.

Идентичность культурально-биохимических свойств штаммов коринебактерий свидетельствует о едином источнике заражения хряков (табл. 4).

При посеве выделенных коринебактерий на среду с теллуридом калия через 2-е суток наблюдали появление черных блестящих колоний.

Выявлено сходство активности дезинфектанта «Лесептик» в отношении выделенных штаммов родококков и коринебактерий при исследовании двух концентраций препарата (табл. 5).

Таблица 5

Результаты изучения устойчивости штаммов *C.pseudotuberculosis* и *R.equi* к дезинфектанту «Лесептик»

Штамм	Концентрация, %			
	1%		3%	
	Экспозиция, (час.)			
	1	3	1	3
<i>C. pseudotuberculosis</i> ( n = 4 )	+	+	-	-
<i>R. equi</i> ( n=4 )	+	+	-	-
Контроль	+	+	+	+

Примечание: (+) - рост микроорганизмов; (-) - отсутствие роста

Обработка культур 3% раствором дезинфектанта «Лесептик» в течение 1 часа ингибировала рост штаммов *C.pseudotuberculosis* и *R.equi*.

Результат патоморфологических исследований вынужденно убитых хряков с положительной реакцией и мышей заражённых per os свежевыведенными штаммами *C. pseudotuberculosis*

Вид животного	Состояние животных	Органы пищеварения	Легкие	Лимфоузлы	Мышцы	Почки	Печень
Вынужденно убитые хряки с положительной реакцией на туберкулин (n = 6)	–	без изменений	очаговое катаральное воспаление	гиперемия бронхиальных л/уз., обызвествление мезентеральных и предлопаточных л/уз.	абсцессы в области шейных мышц	без изменений	без изменений
Зараженные мыши (n = 6) в дозе 0,2 мл	пали через:			без изменений	без изменений	увеличены в объеме, кровенаполнены	увеличены в объеме, кровенаполнены
	7 сут.	12 сут.	20 сут.				
	1	1	4				

**Результаты изучения культурально-биохимических  
свойств штаммов коринебактерий, выделенных от хряков**

Тесты Штаммы <i>C. pseudot.</i>	Оксидаза	Индол	Уреаза	Лизин	Орнитин	Аргинин	Лактоза	Сахароза	Сорбит	Инозит	Манноза	Арабиноза	Глюкоза	Маннит	$\beta$ -галактоза	Фенил-аланин	Малонат Na
4 штамма	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-

Примечание: (+) – положительный результат; (-) - отрицательный результат.

Мы считаем, что появление положительных туберкулиновых реакций у завезённых хряков из Омской области, связано с коринебактериозом, вызванным *C.pseudotuberculosis* о чём свидетельствуют следующие обстоятельства:

- отсутствие в посевах на плотных яичных средах родококков и микобактерий, в том числе и микобактерий туберкулеза;
- наличие в посевах штаммов, идентифицированных по культурально-биохимическим, морфологическим, хемотаксономическим признакам как *C.pseudotuberculosis*.

Выделенные штаммы коринебактерий отличались умеренной вирулентностью для хряков и мышей, идентичными культурально-биохимическими свойствами при изучении их с СИБ, высокой устойчивостью к дезинфектанту «Лесептик», сравнимой с таковой для микобактерий и родококков.

Положительные реакции на туберкулин у свиней и хряков в хозяйствах Нижегородской, Орловской областей вызваны в основном сенсбилизацией скота родококками и коринебактериями (вид *C.pseudotuberculosis*). Обнаружение родококков у свиней в свиноводческом комплексе «Ильиногорское» у свинопоголовья из ОАО «Дзержинское», от крупного рогатого скота совхоза «Горьковский» с одинаковыми культурально-биохимическими признаками (СИБ) свидетельствовало о едином источнике заражения. Таким источником явился завод по изготовлению комбикормов, в котором присутствовали родококки с теми же фенотипическими свойствами. Штаммы коринебактерий от хряков также образовали клон, указывающий на единый источник племенное хозяйство Омский «Бекон», где были закуплены хряки.

### **2.2.1.5. Микобактериоз, вызванный *Mycobacterium xenopi* у крупного рогатого скота**

В двух рядом расположенных животноводческих хозяйствах в Рязанской области с крупным рогатым скотом были выявлены положительно реагирующие на туберкулин животные. При убое у ряда животных были выявлены туберкулёзоподобные изменения в лимфатических узлах, печени и легких. При посеве проб патологического материала на плотные яичные среды через 5-6 недель выращивания при 37°C появились отдельные непигментированные колонии в R-S форме. Всего было получено 6 штаммов от разных животных. Целью работы явилась идентификация выделенных культур до вида. Все 6 штаммов микобактерий были отнесены к медленнорастущим микобактериям. Колонии R-S – формы, в мазке тонкие палочки, расположенные частоколом. После нескольких пересевов на среде Левенштейна-Иенсена у четырех штаммов появилось желтое окрашивание колоний. Штаммы росли при 37°C медленнее, чем при 42°C. Скудно росли при 45°C и роста не было при 25°C. Штаммы росли на плотной яичной среде с салицилатом натрия, не росли на среде с 5% NaCl, не обладали уреазной активностью. Таким обра-

зом, по результатам ключевых культурально-биохимических тестов штаммы не относились к туберкулезным микобактериям, а отсутствие роста при 25<sup>0</sup>С и оптимальный рост при 42<sup>0</sup>С отличали штаммы от комплекса *M. avium-intracellulare*. При исследовании жирнокислотного состава клеток шести штаммов микобактерий получены характерные профили миколовых кислот: пик высокомолекулярной миколовой гексакозановой кислоты (C<sub>26:0</sub>) значительно превосходил пик миколовой тетракозановой кислоты (C<sub>24:0</sub>), отмечено не только большое количество насыщенных высокомолекулярных кислот с числом углеродных атомов 22, 24, 26, но и значительное количество ненасыщенных компонентов с такой же длиной углеродной цепи. Такой тип жирнокислотного состава клеток характерен для вида *M. хеорі*. Штаммовые особенности микобактерий выявляли при использовании 16 ферментативных тестов с СИБ. По характеру ферментации штаммы были разделены на три группы, что может свидетельствовать о широком распространении микобактерий вида *M. хеорі* в данной местности, о множественных источниках заражения животных. *M. хеорі* – условно-патогенный вид, относящийся к медленно растущим микобактериям, с вариательно пигментированными (чаще ярко желтыми) колониями, с оптимальной температурой роста 39-42<sup>0</sup>С, не растущий при 25<sup>0</sup>С.

В результате проведенных исследований наиболее четким признаком при идентификации *M. хеорі* явился состав миколовых жирных кислот клеток микобактерий. Это наиболее консервативный признак микобактерий, не изменяющийся или мало изменяющийся при различных условиях выращивания микобактерий (среда, температура, возраст культуры и т.д.). Газохроматографические спектры жирных кислот позволяют эффективно проводить дифференциацию основных патогенных и условно-патогенных видов микобактерий, наиболее часто вызывающих заболевание животных, что особенно ценно при отклонениях некоторых биологических свойств у микроорганизмов в условиях интенсивных лекарственных обработок и вариабельности экологии окружающей среды.

Таким образом, впервые у положительно реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота на территории Российской Федерации обнаружен микобактериоз, вызванный штаммами вида *M. хеорі*, а наиболее характерным признаком штаммов *M. хеорі* является, выявляемый методом сопиролиза, состав высокомолекулярных эфиров жирных миколовых кислот с числом углеродных атомов 22,24,26 с типичными двойными пиками насыщенных и ненасыщенных кислот.

### **2.2.1.6. Новый способ хранения микроорганизмов в лаборатории**

Получение и сохранение коллекционных культур микроорганизмов без утраты их свойств, представляет большую важность не только для научно-исследовательских работ в области микробиологии и биохимии, но и для практической медицины, ветеринарии и тех областей промышленности и сельского хозяйства, в которых применяются эти культуры. Поддержание



отобранных чистых культур микроорганизмов путем периодических частых пересевов на свежие питательные среды является трудоемким, требует много времени и средств и связано с другими существенными недостатками: отмиранием микробов с течением времени, наследственной изменчивостью микробов вследствие продолжающегося мутационного процесса или (и) случайного отбора менее ценных форм при культивировании, в некоторой степени – опасностью контаминаций при пересевах.

**Для опытов использовали следующие культуры:** *Mycobacterium smegmatis* № 4, *M. avium* №7, полученные из ГИСК имени Л.Тарасевича в виде лиофильно высушенных культур в ампулах и выделенный от свиней штамм *R. equi* №12.

Штаммы *M.smegmatis*, *M.avium* и *R.equi* высевали на яичную твердую питательную среду Левенштейна - Иенсена, выращивали при температуре 37°C и использовали для изготовления суспензии в изотоническом растворе хлорида натрия ( $\approx 5$  ед. по стандарту мутности). Стерильно наносили 0,1 мл суспензии на поверхность стерильного кусочка фильтровальной бумаги размером 1,5 - 2,0 см<sup>2</sup>. Кусочки бумаги с суспензией высушивали при комнатной температуре в стерильном контейнере, а затем опускали в стерильные картриджи, стерильные пенициллиновые флаконы и пластиковые пакеты. Каждую ёмкость закрывали в стерильных условиях. Контейнеры с запечатанными культурами помещали в сейф и хранили при комнатной температуре в течение года, высевали и изучали ежемесячно.

Культуры на фильтровальной бумаге из трех типов емкостей (стерильные картриджи, пенициллиновые флаконы, пластиковые пакеты) отдельно помещали в пробирки с жидкой питательной средой Сотона, размещивали и оставляли на сутки при 37°C, а затем высевали на среду Левенштейна – Иенсена и выращивали при 37°C.

Для сравнительного исследования ферментативных свойств культур, хранившихся в различных ёмкостях, использовали СИБ.

Испытание всех типов хранения штаммов *M.smegmatis* показало, что культуры выросли на среде Левенштейна – Иенсена при 37°C в течение 2-4 дней, росли в R-форме, не образовывали пигмента ни в темноте, ни на свету, хорошо росли при 25°C и при 45°C, росли на среде с 5% хлористого натрия. Штамм *M.avium* при всех типах хранения сохранял свои культурально-биохимические свойства: вырастал в течение 12-14 дней при 37°C и при 45°C, рос на среде с салицилатом натрия, не обладал способностью к редукции нитратов, уреазой и  $\beta$ -галактозидазой, не образовывал пигмента на свету и в темноте. Штамм *R.equi* вырастал в течение 3-4 дней при 37°C и по культурально-биохимическим свойствам соответствовал исходному штамму. Таким образом, нами разработан удобный и дешёвый способ хранения культур в лабораторных условиях, позволяющий поддерживать основные свойства штаммов на уровне исходного образца.

### **2.2.1.7. Значение лабораторных диагностических исследований в программе эпизоотологического мониторинга туберкулёза с.- х. животных**

Одной из задач явилось определение места данной работы в эпизоотологическом мониторинге туберкулёза с.- х. животных. Несмотря на несомненное значение таких заболеваний как родококкоз, нокардиоз, коринебактериоз либо микобактериозы, вызванные нетуберкулёзными микобактериями, в патологии с.-х. животных, главным всё же является туберкулёз в силу приносимого экономического ущерба животноводству и опасности для людей. Поэтому принципиально важным является дифференциальная диагностика выше приведённых заболеваний и вся программа эпизоотологического мониторинга, состоящая из информационно-диагностического, аналитического и управляющего разделов нередко основывается на качестве бактериологических исследований и идентификации до вида выделенных из биоматериала микроорганизмов. Следует учитывать, что нельзя отрицать наличие туберкулёза у положительно реагирующего на туберкулин скота на основании отсутствия в посевах образцов патологического материала микобактерий туберкулёза. Только бактериологическое подтверждение наличия в посевах других кислотоустойчивых микроорганизмов и их идентификация, дают возможность уверенного диагноза.

### **2.2.2. РАЗРАБОТКА БАКТЕРИЦИДНОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ПРЕДПОСЕВНОЙ ДЕКОНТАМИНАЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОТЖИВОТНЫХ ПОЛОЖИТЕЛЬНО РЕАГИРУЮЩИХ НА ТУБЕРКУЛИН, А ТАКЖЕ ОТ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЁЗОМ ЛЮДЕЙ**

#### **2.2.2.1. Выбор оптимального многокомпонентного дезинфицирующего средства в лабораторных условиях**

Задачей настоящего раздела явился выбор оптимального многокомпонентного препарата, оказывающего в низких концентрациях бактерицидное действие на Грам (+) и Грам (-) микроорганизмы 1-ой и 2-ой групп устойчивости и не влияющего в этих концентрациях на жизнеспособность кислотоустойчивых микроорганизмов. Было исследовано 10 вариантов препарата «Лесептик», содержащих до 8 различных компонентов (табл.6).

Таблица 6

## Состав дезинфектантов типа «Лесептик в %

№№ пп	Дезин- фектант	А	Б	В	Г	Д	У	Ж	З
1	4	20	15	-	10	10	45	-	-
2	5	3	15	8,5	10	10	53,5	-	-
3	6	-	20	5	20	10	45	-	-
4	7	18	20	2	20	2	38	-	-
5	8	19	15	1	15	10	40	-	-
6	9	20	15	-	10	10	35	10	-
7	10	17,5	2	-	15	10	13,5	15	-
8	11	10	15	-	40	10	25	-	-
9	12	10	15	-	-	10	45	-	20
10	13	10	15	-	10	10	35	-	10

Примечание: 1. А – сосновое масло, 5. Д – изопропанол,  
 2. Б – ОП-10 – эмульгатор, 6. У – вода,  
 3. В – изоборнилацетат, 7. Ж – карбомид,  
 4. Г – катамин 8. З – ДФГ - дифенилгуанидин

Из 10 вариантов нами было отобрано четыре дезинфектанта 5, 6, 8, 11, как обладающие наибольшей бактерицидной активностью по отношению к контаминирующим патологический материал микроорганизмам.

Из четырёх отобранных дезинфектантов наибольшей активностью в концентрации 0,3% и экспозиции 15 мин. по отношению к 12 референс-штаммам обладал «Лесептик» 11, с которым проводили дальнейшие исследования [рис.2].

Впоследствии исследования бактерицидной активности препарата 11 были продолжены не только на референс штаммах, но и на свежесыведенных штаммах от свиней свиноводческого комплекса «Ильиногорское», Нижегородской области. Бактерицидная активность препарата «Лесептик» 11 по отношению к бактериям 3 группы устойчивости была также достаточно высокой, но всё же на порядок ниже бактерицидной активности по отношению к микроорганизмам 1-ой и 2-ой групп устойчивости, что позволило эффективно проводить предпосевную обработку патологического материала, убивая контаминанты и оставляя живыми микобактерии, нокардиоформные актиномицеты и коринебактерии.

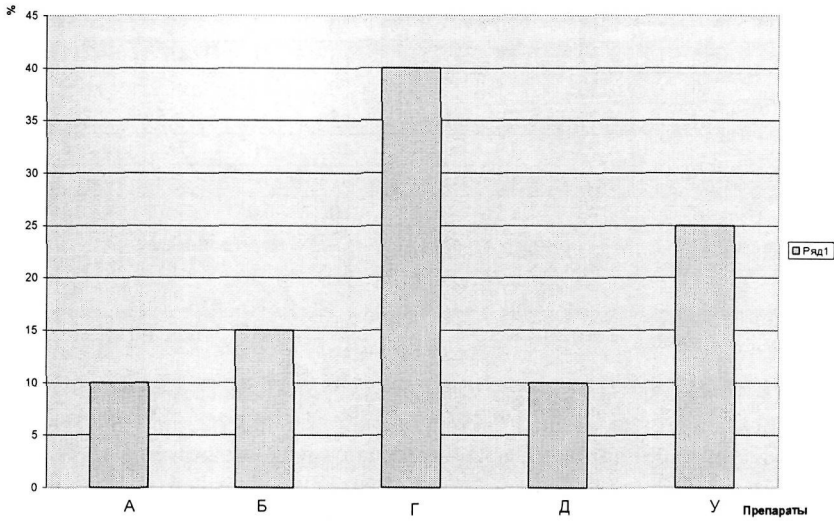


Рис. 2 Состав дезинфектанта «Лесептик»

- А** – сосновое масло;
- Б** – ОП-10 – эмульгатор;
- Г** – катамин;
- Д** – изопропанол;
- У** - вода

### 2.2.2.2. Апробация новых методов деконтаминации посевного материала от больных туберкулёзом людей

Апробацию новых методов деконтаминации посевного материала провели в условиях ГУЗ НО областном противотуберкулёзном диспансере в 2003-2004 г.г. с участием кандидата биологических наук Ильиной Е.А.

Эффективность способа обработки исследуемого патологического материала с помощью 0,1% раствора «Лесептик» при экспозиции 18-24 часа, предлагаемый метод в сравнении с традиционным методом предпосевной обработки с использованием 10% раствора трёхзамещённого фосфорнокислого натрия (базовый вариант) представлена в таблице 7.

Таблица 7

Сравнительная эффективность выявления микобактерий туберкулеза предлагаемым и базовым методом с люминесцентной микроскопией посевного осадка.

Показатели	Метод	Количество проб	$P \pm m_p, \%$
Всего исследовано проб	Предлагаемый	6186	
	Базовый	6917	
Микобактерии выявлены методом посева	Предлагаемый	1065	$17,2 \pm 0,5$
	Базовый	1180	$17,1 \pm 0,4$
Микобактерии выявлены ЛЮМ	Предлагаемый	727	$11,8 \pm 0,4$
	Базовый	642	$9,3 \pm 0,3$
Выявлены бактериоскопически от общего количества положительных результатов	Предлагаемый	727	$59,7 \pm 1,4$
	Базовый	642	$52,5 \pm 1,4$

Примечание: достоверность разности по Стьюденту ( $P < 0,05$ ) предлагаемого и базового методов

Как видно из таблицы, эффективность предлагаемого метода (при окраске по БОЮ и исследовании на люминесцентном микроскопе (ЛЮМ) на 2,5% ( $p < 0,05$ ) выше, чем базового, а эффективность бактериоскопии от общего количества положительных результатов у предлагаемого нами способа на 7,2% выше, чем у базового.

Как видно из таблицы 8 при использовании предлагаемого метода эффективность выявления в патологическом материале измененных (не растущих) микобактерий повышается в 3,5 раза.

**Сравнительная эффективность бактериовыделения  
при анализе положительных результатов**

Показатели	Метод	
	Предлагаемый	Базовый
Всего выявлено случаев бактериологического выделения всеми методами в т.ч.:	1217 (19,7 ± 0,5)*	1223 (17,7 ± 0,4)
- одновременно посевом и ЛЮМ	575 (9,3 ± 0,2)*	599 (8,6 ± 0,2)
- только посевом при отрицательной микроскопии	490 (7,9 ± 0,3)	581 (8,4 ± 0,3)
- только микроскопией при отрицательном посеве	152 (2,5 ± 0,2)*	43 (0,6 ± 0,1)

Примечание: В скобках - ( $p \pm m_p$ , %)

\* достоверность разности по Стьюденту ( $P < 0,05$ ) предлагаемого и базового способов

Как видно из таблицы 8 при использовании предлагаемого метода эффективность выявления в патологическом материале измененных (не растущих) микобактерий повышается в 3,5 раза.

### **2.2.2.3. Разработка нового способа деконтаминации материала от положительно реагирующих на туберкулин сельскохозяйственных животных**

Была изучена эффективность применения препарата «Лесептик» для предпосевной деконтаминации патологического материала от положительно реагирующих на туберкулин животных.

Были проведены три эксперимента по изучению деконтаминационной эффективности препарата «Лесептик»:

- первый опыт в 2003 г. проводили на патологическом материале от свиноматок и хряков свиногомплекса «Ильиногорское». Хряки незадолго до опыта были завезены из Омской области из племенного объединения «Бекон» и давали положительную реакцию на туберкулин.

- второй опыт проведён в 2004 г. на патологическом материале от свиноматок и павших новорождённых поросят из свиногомплекса «Ильиногорское» и от крупного рогатого скота, положительно реагирующего на туберкулин из совхоза «Горьковский».

- третий опыт в 2006 г. поставлен на патологическом материале от больных туберкулёзом и положительно реагирующих на туберкулин коровах из 4 хозяйств Рязанской области.

Деконтаминацию препаратом «Лесептик» проводили следующим образом: ткани разрезали на кусочки размером около 0,5 см<sup>3</sup>, помещали в ступку, заливали раствором «Лесептик» при различных концентрациях и экспозициях, затем раствор сливали, образцы промывали дважды изотоническим раствором хлорида натрия, кусочки ткани тщательно растирали в ступке. Из полученной суспензии делали посеы. Одновременно проводили обработку об-

разцов по методике Аликаевой А.П. Посевы делали на 6-10 пробирок на среды Левенштейна-Иенсена и Финн-2. В трёх опытах были использованы 4 варианта обработки препаратом «Лесептик»:

- 1 – 2% раствор препарата «Лесептик», экспозиция 15 минут.
- 2 – 1% раствор препарата «Лесептик», экспозиция 30 минут.
- 3 – 0,5% раствор препарата «Лесептик», экспозиция 3 часа.
- 4 – 0,3% раствор препарата «Лесептик», экспозиция 18-24 часа.
- 5 – по методике Аликаевой, 6% - ным раствором серной кислоты.

В опыте первом проводили предпосевную деконтаминацию образцов патологического материала от 11 животных (таблица 9).

В варианте 1 не было роста в течение 2 месяцев наблюдения, это объясняется жёсткой обработкой материала.

Таблица 9

Результаты деконтаминации патологического материала от положительно реагирующих на туберкулин свиноматок и хряков с применением препарата «Лесептик» (первый опыт)

Животные	Методы деконтаминации				
	1	2	3	4	5
Хряк 1	-	*	*	к	-
Хряк 2	-	*	к	к	-
Хряк 3	-	к	к	*	-
Хряк 4	-	к	нп	нп	-
Свиноматка 1	-	-	нп	нп	-
Свиноматка 2	нп	-	г	г	-
Свиноматка 3	нп	-	г	г	-
Свиноматка 4	-	-	-	м	-
Свиноматка 5	-	-	-	нп	-
Свиноматка 6	-	-	г	*	-
Свиноматка 7	-	г	г	г	-

Примечание: (-) - нет роста; (\*) - рост посторонней микрофлоры (грибы, стафилококки); (нп) - не проводили исследование; (к) - коринебактерии; (г) - родококки; (м) - микобактерии

В первом опыте из патологического материала от свиноматок при обработке 0,3% препаратом «Лесептик» в экспозиции 24 часа или 0,5% препаратом «Лесептик» в экспозиции 3 часа на среде Левенштейна-Иенсена вырастали за 3-4 дня желтые, слизистые колонии без поверхностного мицелия отнесённые нами на основании культурально-биохимических и хемотаксономических исследований к *R. equi*. Из патологического материала от хряков, завезенных из Омской области при том же типе обработки вырастали за 3-4 дня желтые или коричневые колонии на основании культурально-биохимических и хемотаксономических исследований отнесены к *S. pseudo-tuberculosis*.

От свиноматки под № 4 были выделены микобактерии, по характерному сочетанию пиков доказановой кислоты и тетракозановой ( $C_{22}: 0 > C_{24}: 0 = 1$ )

отнесённых к виду *M. flavescens*. Диагноз подтвердился данными культурально - биохимических исследований.

В первом опыте выявлены лучшие варианты обработки образцов патологического материала от свиней и хряков – 0,3% раствор препарата «Лесептик» при экспозиции 24 часа и 0,5% раствор препарата «Лесептик» при экспозиции 3 часа, позволяющие выявлять нокардиоформные актиномицеты и микобактерии. В данном опыте обработка по Аликаевой не дала результатов.

Во втором опыте (свиноматки, поросята и крупный рогатый скот) были использованы образцы патологического материала от 30 животных, а также три образца корма. При обработке по Аликаевой из двух образцов патологического материала от свиней на среде Левенштейна-Иенсена выросли мелкие белые колонии в течение 30-35 дней, а из шести образцов патологического материала выросли желтоватые, крупные, слизистые колонии в течение 8-15 дней. При обработке препаратом «Лесептик» 0,5% раствором при экспозиции 3 часа результаты были следующие: мелкие белые колонии от свиней выросли из 5 образцов через 10-15 дней, крупные слизистые, желтые колонии из 15 образцов через 4-5 дней.

Мелкие белые колонии, выросшие после обработки двумя методами, содержали тонкие кислотоустойчивые палочки; при изучении скорости их роста (по Kepler) культуры выросли за 4-5 дней. При исследовании жирнокислотного состава клеток на газовом хроматографе соотношение пиков  $C_{24:0}$  и  $C_{22:0}$ , а также другие особенности хроматограмм свидетельствовали о принадлежности штаммов к сапрофиту *M. flavescens*. Все штаммы *M. flavescens* были выделены только от свиноматок и исследование их индивидуальных свойств с помощью 9 тестов СИБ указывало на несомненное сходство выделенных штаммов, объединяющих их в одну группу (клон).

Родококки, выделенные из трех образцов корма так же выросли при обработке препаратом «Лесептик» на 5-6 дней раньше, чем при обработке по Аликаевой.

Третий опыт по изучению деконтаминации посевного материала препаратом «Лесептик» проводили на патологическом материале от 12 голов крупного рогатого скота из четырех хозяйств Рязанской области: ОПК «Маяк», Уховский р-н; ООО фирма «Нива», Скопинский р-н; ООО «Авангард», Рязанский р-н; АО «Макеевский», Клепиковский р-н. Были использованы четыре варианта обработки патологического материала дезинфектантом «Лесептик» (табл. 10).

При обработке патологического материала по 3 и 4 вариантам выявлен рост не только микобактерий, но и нокардиоформных актиномицетов, показана идентичность результатов обработки патологического материала 1 и 5 вариантами деконтаминации, и ускоренный рост микобактерий при 3 и 4 вариантах по сравнению с 1 и 5 вариантом. Изучение культурально-биохимических и хемотаксономических свойств выделенных штаммов позволило их отнести к следующим таксономическим группам: микобактерии – *M. avium*, родококки – *R. equi*.



Результаты предпосевной обработки патологического материала от больных туберкулезом и положительно реагирующих на туберкулин коров (третий опыт)

№ п/п	Инв. № животных	Варианты деконтаминации и сроки роста бактерий (дни)					Хозяйство
		1	2	3	4	5	
1	0003	32	32	29	К 24	32	«Маяк»
2	0177	33	33	29	22	32	- « -
3	без №	32		30	К 23	30	- « -
4	0053	52		50		53	- « -
5	0487	50		41		50	- « -
6	0002	55		42		56	- « -
7	0413	28		R 26		28	- « -
8	02433	30		R 25	R 24	30	- « -
9	0443	30		R 24	R 26	31	- « -
10	без №	35	33	30	30	36	«Нива»
11	3028	29	24	R 22		29	«Авангард»
12	2888	32	30	R 28		32	«Макеевский»

Примечание: (R) – на отдельных пробирках рост родококков через 4-5 дней; пустые графы – исследование не проводили; (К) – контаминация в 1 пробирке; (\*) - цифры указывают на скорость роста микобактерий.

В результате проведённых более 450 исследований нами предложены новые способы деконтаминации биоматериала от животных, положительно реагирующих на туберкулин, обеспечивающие возможность роста на яичных плотных питательных средах актиномицетов, не относящихся к микобактериям туберкулёза и ускоряющие рост штаммов коринебактерий и родококков.

### 2.2.3. РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ И НОКАРДИОФОРМНЫХ АКТИНОМИЦЕТОВ

Наиболее часто в ветеринарной практике используют плотные питательные среды Левенштейна-Йенсена, Финн-2 [и др.], состоящие из солевой основы, яиц и малахитовой зелени. Для научных целей чаще используют среды, состоящие из солевой основы и агара, в которые в качестве стимуляторов роста добавляют сыворотку крови человека или животных, цитратную кровь, олеиновую кислоту или комплексы, содержащие витамины, жирные кислоты и др. Все эти среды нестандартны и нетехнологичны, так как добавки вынужденно вносят в готовые среды перед посевом культур.

Целью исследований в данной главе явилось изготовление плотной питательной среды для выращивания микобактерий и нокардиоформных акти-

номицетов, пригодной для исследовательской и музейной работы, способной стимулировать рост культур, дающей хорошую визуализацию начального роста колоний, отличающуюся технологичностью изготовления.

Основой трёх экспериментальных питательных сред явился солевой состав среды Сотона, гумивит и агар ( среда АГ). В среду АГЖ входит дополнительно водный раствор желтка куриного яйца в соотношении 1:1, а в среду АГЖЗ добавляют раствор малахитового зелёного в количестве 0,2%.

Состав среды АГ состоит из следующих компонентов:

Л-аспарагин	4,0 г.
Двухзамещённый фосфорнокислый калий	0,5 г
Сернокислый магний	0,5 г
Лимонная кислота	2,0 г
Лимоннокислое аммиачное железо	0,05г
Пируват натрия	0,5 г
Глицерин	40,0 г
Агар «Дифко»	30,0 г
Гумивит	90 - 95,0мл
Дистиллированная вода	1000,0мл

pH среды доводят до 7,1-7,2 5% раствором едкого натра.

### 2.2.3.1. Характеристика «Гумивита»

В предлагаемые среды в качестве стимулятора роста входит гумивит. Гумивит представляет собой высокодисперстный золь натриевых солей комплекса гумусовых кислот – гуминовых, гуматомелановых и фульвокислот, полученных методом экстрагирования из сфагово-осоковых торфов высокой степени разложения (не менее 35%) из месторождения «Чистое» Нижегородской области. Это жидкость темно-коричневого до черного цвета со специфическим сладковатым запахом, pH 12-13. Препарат обладает высокой биологической активностью и хорошей стабильностью, обеспечивающей длительную сохранность его свойств. Раствор солей гуминовых кислот состоит из длинных фрагментарных цепочек с различными функциональными группами, взаимное расположение которых играет важную роль в обеспечении биологической активности. Наиболее важными в этом плане являются карбоксильные (COOH) и фенольные (OH) группы, способные образовывать хелатные комплексы с микроэлементами и в таком виде транспортировать их в клетку микроорганизма, они же обеспечивают высокую обменную емкость этих соединений.

### **2.2.3.2. Изготовление плотных питательных сред: АГ, АГЖ, АГЖЗ для роста микобактерий и нокардиоформных актиномицетов**

Среду АГ готовят следующим образом: в химически чистую стерильную колбу емкостью 2,0 л наливают 300,0 мл дистиллированной воды, подогревают на водяной бане до 75-85°C. В воде в указанном порядке растворяют следующие компоненты: лимонную кислоту, магний сернокислый, двухзамещенный фосфорнокислый калий, лимоннокислое аммиачное железо, пируват натрия, глицерин, устанавливают рН до 7,1-7,2 препаратом «Гумивит» и добавляют агар. Каждый компонент добавляют в жидкость после того, как растворится предыдущий. После внесения всех компонентов общий объем доводят стерильной дистиллированной водой до 1000 мл. Раствор автоклавируют при 1 атм. в течение 30 мин., разливают по пробиркам и скашивают. Для оценки качества среды использовали референс штаммы микобактерий.

Изготовление плотной питательной среды АГЖ, АГЖЗ для выращивания микобактерий и нокардиоформных актиномицетов, содержащей нативный яичный желток, пригодной для научно-исследовательской и практической работы способной стимулировать рост культур был взят состав среды АГ и дополнен яичным желтком, а в среду АГЖЗ добавляют раствор малахитового зелёного в количестве 0,2%.

Свежее яйцо хорошо промывают в проточной воде, а затем протирают 96° этиловым спиртом. Чистое яйцо разбивают и отделяют белок от желтка в стерильных условиях. В стерильной колбе смешивают желток с дистиллированной водой в соотношении 1:1 и 250,0 мл полученный раствор добавляют в расплавленную агаровую среду, перемешивают, разливают по пробиркам по 3 мл и скашивают и ставят на контроль в термостат.

### **2.2.3.3. Изучение на новых питательных средах скорости, интенсивности роста референс - штаммов микобактерий и свежевыделенных штаммов из образцов патологического материала от положительно реагирующих на туберкулин животных**

Скорость роста штаммов на среде АГ сравнивали с ростом на средах Левенштейна-Йенсена и Финн-2. Было выявлено, что скорость роста при использовании разведения культур по Кеплер на среде АГ несколько медленнее, чем на традиционных средах у штаммов *M.tuberculosis*, *M.avium* и *M.bovis*, (БЦЖ). Остальные штаммы (*M.bovis* (Vallee, Ravenal), *M.smegmatis* № 4, *M.fortuitum* № 7) выросли с той же скоростью.

Среда АГ использовалась нами для получения бактериальной массы при проведении хемотаксономических исследований жирных кислот микобактерий на газовом хроматографе, поскольку яичные среды содержат определённое количество жирных кислот и липидов.

Готовая среда имеет интенсивно коричневый цвет, на фоне которого хорошо видны даже очень мелкие колонии в начальной фазе роста (табл.11).

Таблица 11

Сравнимые данные скорости роста микобактерий  
на двух средах

Штаммы	Сроки появления роста колоний в днях	
	Среда Левенштейна-Йенсена	Среда предлагаемая АГ
<i>M.bovis</i> (Vallee)	14	13
<i>M.bovis</i> (BCG)	15	15
<i>M.tubercul.</i> (Academia)	9	10
<i>M.tubercul.</i> H <sub>37</sub> Ra	9	10
<i>M.avium</i> ГИСК	7	7
<i>M.avium</i> 44	7	9
<i>M.avium</i> 659	8	10
<i>M.phlei</i>	2	2
<i>M.smegmatis</i> 53	2	2

Таблица 12

Сравнительные данные по скорости роста нокардий и родококков  
на двух средах

Штаммы	Сроки появления роста колоний в днях	
	Среда Левенштейна-Йенсена	Предлагаемая среда АГ
<i>Rhodococcus equi</i> 12	2	2
<i>Rhodococcus equi</i> 13	2	2
<i>Rhodococcus equi</i> 5	2	2
<i>Rhodococcus equi</i> 6	2	2
<i>Nocardia asteroides</i>	3	2

Как видно из таблицы 12 скорость роста родококков и нокардий на двух средах идентична.

Изучали скорость роста микобактерий на среде АГЖ в сравнении с традиционными средами.

Для посева использованы референс-штаммы микобактерий (*M.bovis* (шт.Vallee и BCG), *M.tuberculosis* (шт.Academia, H<sub>37</sub>Ra) *M.avium* (шт. ГИСК), *M.smegmatis* (4), *M.phlei* (4), *Nocardia asteroides*, а также свежeweделенные штаммы родококков и коринебактерий. Все штаммы хранили на среде Левенштейна-Йенсена в условиях холодильника при +4°C. Для посева на опытную и контрольные среды готовили суспензии, дающие рост 30-60 КОЕ при посеве 0,1мл. Все опыты были повторены трижды. Посев каждого штамма проводили на 3-5 пробирок каждой среды. Среды АГЖ и АГЖЗ использова-

ли для выявления микобактерий и других нокардиоформных актиномицетов из патологического материала от животных положительно реагирующих на туберкулин с применением различных способов предпосевной обработки патологического материала. Среды АГЖ и АГЖЗ обеспечивала такую же скорость роста микобактерий, как и среда Левенштейна-Йенсена и Финн-2. Нами так же была исследована интенсивность роста (в днях) референс-штаммов микобактерий на разных питательных средах. Среда АГЖ обеспечивала хорошую интенсивность роста, сравнимую с таковой на средах Левенштейна-Йенсена и Финн-2 (табл. 13).

Таблица 13

Интенсивность роста *M.bovis* (шт. Vallee) на плотных питательных средах

Питательные среды	Дни									
	7	9	10	11	12	13	14	15	16	24
Левенштейна-Йенсена	-	-	-	-	-	+	+	++	++	+++
Финн-2	-	-	-	-	+	+	+	++	++	+++
АГЖ	-	-	-	+	++	++	++	+++	+++	++++

Примечание: (+) – единичные колонии; (++)– 10-20 колоний; (++) – 21-50 колоний; (++++) – сплошной рост (-) - нет роста

Из 6 хозяйств Рязанской области поступил на исследование патологический материал от крупного рогатого скота, а так же от свиней и хряков из свиноводческого комплекса «Ильиногорское» Нижегородской, ОАО «Знаменский» Орловской областей с положительными реакциями на туберкулин. Провели посевы образцов патологического материала на три среды с обработкой 0,5% раствором препарата «Лесептик» и экспозицией 3 часа.

Скорость роста штаммов приведена в табл.14.

Таблица 14

Скорость роста (в днях) штаммов микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий на разных средах

Питательная среда	Штаммы от крупного рогатого скота					Штаммы от свиней										
	<i>M. bovis</i>					<i>M. avium</i>	<i>M. fort.</i>	<i>R. equi</i>	<i>M. avium</i>		<i>R. equi</i>			<i>C. pseudotub.</i>		
Левенштейна-Йенсена	29	29	30	33	30	30	31	21	4	30	30	4	6	4	5	7
Финн-2	29	30	29	33	31	30	30	20	5	30	31	5	5	4	4	7
АГЖЗ	26	24	24	27	29	14	25	15	2	10	15	2	2	2	3	4

Как видно из данных таблицы скорость роста выделенных из патологического материала культур от крупного рогатого скота и свиней на среде АГЖЗ в половине случаев была несколько выше, чем на средах Левенштейна-Йенсена и Финн-2.

Нами также изучалась высевомость культур микобактерий туберкулёза из образцов патологического материала от больного туберкулёзом и нокардиоформными актиномицетными инфекциями животных из Рязанской и Орловской областей на трёх средах (табл.15).

Таблица 15

Высеваемость культур микобактерий туберкулеза из образцов патологического материала от больного туберкулезом скота на разных средах (обработка биоматериала по методике А. П. Аликаевой)

Питательная среда	Число посевов (пробирки)	Рост культур		Контаминация посторонней микрофлорой	
		пробирки	%	пробирки	%
Левенштейна-Йенсена	40	23	57	2	5
Финн-2	40	22	54	1	2
АГЖЗ	40	30	73	1	2

Как видно из таблицы 15 высевомость культур микобактерий туберкулёза на среде АГЖЗ несколько выше, чем на средах Левенштейна-Йенсена и Финн-2, а контаминация посторонней микрофлоры идентична.

Таким образом, нами разработаны три питательных среды на основе агара, гумивита, желтка соответствующих поставленным задачам, а именно: стимулирующие рост культур, дающих хорошую визуализацию начального роста светлых колоний на коричневом фоне, отличающуюся технологичностью изготовления и дешевизной и главное, дающих возможность успешно изучать культурально - биохимические свойства штаммов.

## **2.2.4. РАЗРАБОТКА НОВОГО СПОСОБА ДЕЗИНФЕКЦИИ ЖИВОТНОВОДЧЕСКИХ ПОМЕЩЕНИЙ ПРЕПАРАТОМ «ЛЕСЕПТИК»**

### **2.2.4.1 Дезинфекция на свиноводческом комплексе «Ильиногорское»**

Изучение причин возникновения родококковой инфекции в хозяйствах Нижегородской области и, в частности на свиноводческом комплексе «Ильиногорское» привело нас к необходимости оценки качества дезинфекции, применяемой в течение 36 лет существования этого хозяйства. Традиционная дезинфекция на свиноводческом комплексе «Ильиногорское» заключалась в механической обработке с использованием 3% едкого натрия, аэрозольной

обработке 3% формальдегидом и побелке всего помещения 10% свежегашеной известью. Однако наши исследования, проведённые после традиционной дезинфекции, выявили массивное загрязнение всех обработанных поверхностей микроорганизмами трёх групп устойчивости. Исследование растворов 3% каустика в ножных ваннах (смена раз в три дня) выявило их массивное загрязнение различной микрофлорой. Возможно, одной из причин этому была устойчивость микроорганизмов, выработанная в процессе 36-летнего использования одних и тех же дезинфектантов.

В течение года нами трижды, с интервалом в три месяца проводились исследования обсеменённости микроорганизмами 1, 2 и 3 групп устойчивости производственных помещений комплекса. Исследования заключались в изучении обсеменённости производственных помещений до традиционной обработки, применяемой каждые 4 месяца после вывода животных, затем после традиционной обработки. Загрязнения пола, решёток достигало  $10^{10}$  КОЕ на 1 мл. Несколько меньшим было количество микроорганизмов на стенах, на кормушках и на перегородках в боксах. Количество микроорганизмов на стенах, на перегородках и на кормушках после традиционной обработки уменьшалось лишь на 40-50% от исходного.

Культуры референс штаммов и, особенно культуры, выделенные от животных свиноводческого комплекса проявили высокую устойчивость к формальдегиду и едкому натру, что, несомненно, требует замены дезинфицирующих средств на новые.

На основании проведённых ранее лабораторных исследований было решено испытать препарат «Лесептик» в качестве дезинфектанта в производственных животноводческих помещениях. Было получено разрешение на проведение ограниченных испытаний в хозяйствах Нижегородской области.

Разработанный нами совместно с сотрудниками ЦНИЛХИ препарат «Лесептик» был утверждён в Фармкомитете и разрешён к использованию в медицинской практике (ТУ 9392-275-00281074-2000). По заключению Фармкомитета препарат относится к 3 классу умеренно опасных веществ, к 4 классу малоопасных соединений при нанесении на кожу и ингаляционном воздействии летучих компонентов. Срок годности препарата 5 лет, а рабочие растворы сохраняют активность 20-25 дней.

Перед нами стояла задача разработать способы применения «Лесептика» в животноводстве.

Изучение свойств «Лесептик» было начато с исследования его влияния на животных. Опыты проводили в СПК «Ждановский» Нижегородской области на телятах в течение 2-х месяцев. Испытание проводили с помощью устройства САГ-1 в помещении телятника общей площадью 120 м<sup>2</sup>. Распыляли препарат в концентрации 0,1% в количестве 1-3 мл на 1 м<sup>3</sup> помещения. Экспозиция составляла 30-50 мин. Обработку телятника проводили 2 раза в неделю в течение 2-х месяцев. В телятнике постоянно находилось 20 телят в возрасте от 2-х дней до 1 месяца. За всё время применения «Лесептик» в виде аэрозоля у телят не было проявления конъюнктивита,

кашля и аллергических кожных высыпаний. Температура, пульс, частота дыхания были в пределах физиологической нормы. У 2-х телят, поступивших в телятник с диагнозом бронхопневмония, во время распыления препарата отмечали незначительное увеличение кашля. Таким образом, «Лесептик» при применении в виде аэрозоля не оказал негативного влияния на здоровье молодняка крупного рогатого скота.

#### **2.2.4.2. Испытание препарата «Лесептик» на тест-объектах**

Опыты по определению степени снижения бактериальной обсеменённости различных поверхностей проводили в лабораториях института и свиноводческого комплекса, на различных тест-объектах, загрязнённых искусственно путём нанесения взвесей, содержащих 20 млн. клеток в 1 см<sup>3</sup>. Использовали референс-штаммы: *E.coli* (M.17), *Staph.aureus* (209), *M.smegmatis* (4), *M.bovis* (Vallee), *Penicillium chrysogenum*. В качестве тест-объектов использовали: кафель, дерево, цемент, кусочки батиста, почву с навозом и без навоза. Применяли 0,3, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 % растворы «Лесептик» с различной экспозицией. Результаты опытов свидетельствуют о необходимости применения для обеззараживания микробактерий достаточно высоких концентраций 1,0%-2,0% при экспозиции 18-24 часа, а наиболее длительная экспозиция была необходима для обеззараживания микроорганизмов на тест-объекте «почва с навозом».

Научно-производственные опыты по определению степени снижения бактериальной обсеменённости различных поверхностей провели в условиях свиноводческого комплекса. В качестве основных поверхностей, загрязнённых искусственно и естественно использовали: кафель, дерево, цемент и поверхности стен, выкрашенные масляной краской. В качестве дезинфектанта использовали 0,5 и 1% растворы «Лесептик». Пробы на наличие микрофлоры отбирались через 1, 3 и 20 часов.

Исследования показали, что качественная дезинфекция поверхностей, искусственно загрязнённых кишечной палочкой, достигалась через 1 час после обработки 0,5% раствором «Лесептик». Поверхности, загрязнённые золотистым стафилококком и родококками, не обеззараживались в полной мере. После 3-часовой экспозиции степень обеззараживания поверхностей, загрязнённых стафилококками, достигала 98,35-99,73%, что следует считать удовлетворительным. Однако, на поверхностях, загрязнённых родококками, даже при 20-часовой экспозиции полного обеззараживания не достигалось.

С естественно загрязнённых поверхностей до обработки выделялась разнообразная микрофлора, представленная кокковыми формами – 85,1-97%, бактериями кишечной группы – 7,2-11,7%, грибами, микробактериями и родококками – 2,5-4,5%. Через 1 час после обработки 1% раствором «Лесептик» количество кокковой микрофлоры снизилось до 99,2-100%, бактерии кишечной палочки в смывах отсутствовали. Степень обеззараживания



родококков и микобактерий после 20-часовой экспозиции составила 92,2-93,7%.

### **2.2.4.3. Разработка нового способа дезинфекции животноводческих помещений**

Для повышения обеззараживающей эффективности «Лесептик» по отношению к микроорганизмам 3-й группы устойчивости нами разработан способ его применения в составе взвеси свежегашеной извести. Эффективность способа изучали в нескольких сериях сравнительных опытов в условиях комплекса с применением следующих дезинфицирующих средств:

- 20% взвесь свежегашеной извести;
- 0,7% раствор «Лесептик» в составе 10 и 20% взвесей свежегашеной извести;
- 1% раствор «Лесептик» в составе 10 и 20% взвесей свежегашеной извести.

Растворы «Лесептик» 0,7-1% концентрации в составе взвеси извести готовили путем добавления 70-100 мл препарата «Лесептик» соответственно к 9,93-9,9 л 10-20% взвеси свежегашеной извести или 0,7-1% водный раствор «Лесептик» использовали в качестве разводящей жидкости для приготовления известковой взвеси.

Дезинфекционную обработку проводили после механической и тщательной влажной очистки помещений с применением 3% раствора едкого натра. Качество дезинфекции оценивали по результатам посевов проб смывов с дезинфицируемых поверхностей, которые отбирали до обработки и через 24 часа после обработки. В таблице 16 приводятся данные трёхкратного исследования результатов дезинфекции животноводческих помещений комплекса в сравнении с данными исследований после традиционной обработки, принятой на комплексе.

Результаты исследований показали, что применение 20% взвеси свежегашеной извести обеспечивало снижение обсемененности микрофлорой животноводческих помещений на 43-57%.

Обработка 0,7% раствором «Лесептик» в составе 10 и 20% взвесей свежегашеной извести обеспечивала обеззараживание микроорганизмов 1-й и 2-й групп устойчивости и уничтожение 97-99% микроорганизмов 3-й группы устойчивости. Обработки поверхностей 1% раствором «Лесептик» в составе

10 и 20% взвесей свежегашеной извести обеспечивали полное обеззараживание микроорганизмов 3-й группы устойчивости. При этом не выявлено разницы в подсчете оставшейся живой микрофлоры в зависимости от концентрации свежегашеной извести, в связи с чем считаем наиболее оптимальной концентрацию 1% раствора «Лесептик» в составе 10% взвеси свежегашеной извести.

Таблица 16

Влияние способов дезинфекции на снижение микробной обсемененности помещений в (%)

Объект дезинфекции	Среда Эндо	Солевой агар	Висмут-сульфитный агар	Среда Сабуро	Среда Левенштейна-Иенсена
Стены	<u>98-100</u> 40-50	<u>98-100</u> 45-46	<u>98-100</u> 51-59	<u>98-100</u> 25-46	<u>97-99</u> 20-25
Перегородки	<u>98-99</u> 66-70	<u>99-100</u> 36-50	<u>97-100</u> 50-66	<u>96*-100</u> 38-56	<u>95-100</u> 30-45
Полы	<u>97-100</u> 67-70	<u>96-100</u> 56-71	<u>96-99</u> 66-67	<u>97-99</u> 33-50	<u>96-100</u> 29-31
Решетки	<u>96-100</u> 67-72	<u>98-100</u> 68-70	<u>97-97*</u> 64-90	<u>96-98</u> 40-41	<u>97-100</u> 25-30
Кормушки	<u>95*-99</u> 66-68	<u>95*-99</u> 58-70	<u>99-100</u> 63-70	<u>98-100</u> 40-49	<u>98-99</u> 26-32

Примечание: 1. В числителе - данные предлагаемого способа дезинфекции.

2. В знаменателе – данные базового способа дезинфекции

3. (\*) – рост отдельных колоний бактерий

В серии последующих опытов выявлено, что 0,7-1,0% водные растворы «Лесептик» в дезинфекционных ваннах для дезинфекции обуви у входа в производственные помещения комплекса сохраняли дезинфицирующие свойства в течение 7 дней (табл.17).

Таблица 17

Результаты изучения бактерицидной активности 1% раствора препарата «Лесептик» в ножных ваннах

Ножные ванны	Дни наблюдения и среды															
	Среда Эндо				Солевой агар				Висмут-сульфатный агар				Среда Левенштейна-Иенсена			
	3	5	7	9	3	5	7	9	3	5	7	9	3	5	7	9
Комбинат 1 Коридор	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Комбинат 1 Цех № 3	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Комбинат 2 Коридор	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	±
Комбинат 2 Цех № 1	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	±	+

Примечание: (-) - нет роста, (±)- единичные колонии, (+) – рост.

Результаты однократных обработок животноводческих помещений в совхозе «Горьковский» были менее результативны из-за давних сроков предыдущих дезинфекций (3-5 лет). Следует отметить рост грибов отдельных колоний на среде Сабуро, особенно в посевах с кормушек и пола.

Анализируя полученные данные, мы пришли к выводу, что неудовлетворительные результаты дезинфекции помещений 1% водным раствором «Лесептик» по росту микроорганизмов 3-й группы устойчивости в сравнении с хорошими результатами при его использовании в смеси с 10% взвесью свежегашеной извести были обусловлены недостаточной экспозицией, поскольку водные растворы быстро высыхают и не оказывают губительного действия на микрофлору, в то время как свежегашеная известь обладая гигроскопичностью поглощает влагу из воздуха и дольше остается влажной, в результате чего экспозиция действия «Лесептик» увеличивается, а это особенно важно для кислотоустойчивых бактерий.

## ВЫВОДЫ

1. Микобактерии, родококки, коринебактерии играют существенную роль в патологии свиней и крупного рогатого скота, вызывающих не только положительные туберкулиновые реакции на ППД – туберкулин для млекопитающих и ограниченные поражения лимфатических узлов и тканей у взрослого поголовья, но и тяжёлые заболевания молодняка с летальным исходом (до 50%);

2. На основе комплексного изучения патологоанатомических, патоморфологических, культурально-биохимических, хемотаксономических, серологических и биологических свойств штаммов родококков, выделенных от животных, выявлена принадлежность клинических штаммов к виду *Rhodococcus equi*.

3. Причиной появления положительных туберкулиновых реакций у животных и патоморфологических изменений в органах, падежа новорождённых поросят и телят в возрасте 5-7 недель были штаммы родококков, обсеменяющие корма из завода, обслуживающего эти хозяйства.

4. Разработанный автором антигенный диагностикум (ЛТА) позволяет с высокой специфичностью диагностировать туберкулёз в реакции агглютинации латекса (РАЛ) за 3-4 часа.

5. Причиной появления положительных туберкулиновых реакций и патоморфологических изменений в органах у хряков нередко являются коринебактерии, идентифицированные по совокупности биологических свойств как *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

6. Дана характеристика патоморфологических изменений в органах и тканях при родококкозе и коринебактериозе животных.

7. Впервые на территории РФ от положительно реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота с патоморфологическими туберкулёзоподобными изменениями в органах выделена культура медленнорастущего условно-патогенного вида *M. xenopi*.

8. Важное значение имеют хемотаксономические исследования культур на газовом хроматографе, на основе жирнокислотного состава клеток до родовой и видовой идентификации микобактерий, нокардиоформных актиномицетов и коринебактерий.

9. Выявлено значение семи культурально-биохимических тестов на основе ферментации углеводов и аминокислот для индивидуальной характеристики штаммов кислотоустойчивых микроорганизмов.

10. Разработан многокомпонентный дезинфектант «Лесептик» с высокой бактерицидной активностью по отношению к референс и свежевыделенным штаммам 1, 2 и 3 групп устойчивости.

11. Предложена эффективная предпосевная обработка патологического материала 0,1% раствором препарата «Лесептик» по сравнению с традиционной обработкой 10%-ным раствором трёхзамещённого фосфорнокислого натрия от больных туберкулёзом людей.

Комплексное сочетание посева с люминесцентной микроскопией позволило повысить на 2% выявление микобактерий, а количество микобактерий только бактериологическим методом увеличилось на 2,5-3,5%, что обеспечивает раннюю диагностику туберкулёза.

12. Показана эффективность обработки материала от положительно реагирующих сельскохозяйственных животных с использованием 0,3% раствора препарата «Лесептик» при экспозиции 24 часа, либо 0,5% раствора при экспозиции 3 часа, позволяющей выявлять нокардиоформные актиномицеты и микобактерии более успешно, чем при традиционной обработке 6% - ным раствором серной кислоты.

13. Разработан состав трёх питательных сред для кислотоустойчивых микроорганизмов на основе гумивита, агара желтка стимулирующих рост культур, осуществляющих хорошую визуализацию начального роста колоний на коричневом фоне, позволяющих проводить научные исследования культур невозможные на традиционных плотных яичных средах.

14. Характер устойчивости к растворам формальдегида, едкого натра и препарата «Лесептик» условно-патогенных микобактерий, родококков и коринебактерий позволило отнести их к третьей группе устойчивости.

15. Разработанный способ применения препарата «Лесептик» эффективен для дезинфекции животноводческих помещений в составе 10% взвеси гашёной извести, приготовленной на 1% растворе «Лесептик» и в виде 0,7-1,0% раствора для обработки обуви в дезинфекционных ваннах.

16. Рекомендованные нами меры по профилактике туберкулёза, микобактериозов и актиномицетных инфекций (исследование животных на туберкулёз, деконтаминация материала лесептиком, применение новых сред, смена корма, способ дезинфекции дезинфектантом «Лесептик») позволили исключить возникновение положительных туберкулиновых реакций у взрослого скота и родококкоза у новорождённых поросят и телят, на основании этого исключается необоснованный убой здоровых животных и сокращается размер экономического ущерба.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

### НАУЧНЫЕ РАЗРАБОТКИ АВТОРА ВОШЛИ В СЛЕДУЮЩИЕ НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ:

1. **Технические условия** на «Набор для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в реакции агглютинации латекса РАЛ» (ТУ 9388-001-0067433-99 Утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ, 1999).
2. **Наставление** по применению набора для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в реакции агглютинации латекса (РАЛ) (Утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ, 1999).
3. **Методические рекомендации** по серологической диагностике туберкулеза сельскохозяйственных животных (Утверждены РАСХН, Москва, 1999).
4. **Методические рекомендации** / Новые методы исследования возбудителей антропоознозов. Туберкулёз (Утверждены РАСХН, Москва, 2003).
5. **Временное наставление** по применению дезинфицирующего средства «Лесептик» (Утверждено Комитетом Госветнадзора администрации Нижегородской области, Н.Новгорода, 2001).

### НАУЧНЫЕ РАЗРАБОТКИ АВТОРА ЗАЩИЩЕНЫ ПАТЕНТАМИ:

1. **Способ** получения латексного антигенного микобактериального диагностикума / Пат. РФ 2117294С1; опубл. 10.08.1998 г. Бюл. № 22.
2. **Способ** выявления микобактериальных антигенов/ Пат. РФ 2147125С1; опубл. 27.03.2000 г. Бюл. № 9. – 3с. – 2 табл.
3. **Способ** дезинфекции при туберкулёзе/Пат. РФ 2161508С1; опубл. 10.01.2001г. Бюл. № 1. – 8с.
4. **Способ** выявления микобактериальных антигенов /Пат. РФ 2188428С2; опубл. 27.08.2002г. Бюл. № 24.
5. **Дезинфекционное средство** «Лесептик»/Пат. РФ 2197994С2; опубл. 10.02.2003 г. Бюл. № 4. – 6с.
6. **Дезинфицирующее средство**/Пат. РФ 2224544С1; опубл. 27.02.2004 г. Бюл. № 6.
7. **Способ** бактериологического выявления нокардиоформных актиномицетов / Пат. РФ 2321636С1; опубл. 10.04.2008 г. Бюл. № 10.
8. **Питательная среда** для выделения из биологического материала и культивирования микобактерий/Пат. РФ 2315812; опубл. 27.01.2008г. Бюл. №3.
9. **Способ** дифференциации аллергических реакций на ППД-туберкулин для млекопитающих животных/ Пат. РФ 2288953С1; опубл. 10.12.2006 г. Бюл. №34.
10. **Способ** оценки антагонистической активности молочнокислых бактерий кишечной группы к патогенным микобактериям с использованием двухслойной среды / Пат. РФ 2317332 С1; опубл. 20.02.2008г. Бюл. №5.

11. **Плотная питательная среда** для культивирования микобактерий/ Пат. РФ 2320716; опубли. 27.03.2008 г. Бюл. № 9.

12. **Питательная среда** для культивирования микобактерий и нокардиоформных актиномицетов/Пат. РФ 2322495; опубли. 20.04.2008 г. Бюл. № 11.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:**

1. Слинина, К.Н., Лазовская А.Л., Воробьева З.Г. Препарат «Лесептик» для дезинфекции животноводческих помещений // Сб. научных трудов НИВИ НЗ РФ.- Н.Новгород, 2004. – С. 48-53.

2. Слинина, К.Н. Обработка патологического материала для бактериологического исследования от положительно реагирующих на туберкулин животных //Сб. научных трудов НИВИ НЗ РФ.- Н.Новгород, 2006. – С.47-51.

3. **Слинина, К.Н., Лазовская А.Л., Кульчицкая М.А., Дручкова М.В. Способ хранения культур в лаборатории // Доклады Российской академии с./х. наук. - М., 2006. - №6. – С.54-55.**

4. Слинина, К.Н., Лазовская А.Л., Воробьева З.Г. Выделение коринебактерий из патологического материала с положительными туберкулиновыми реакциями //Сб. научных трудов НИВИ НЗ РФ.- Н.Новгород, 2006. – С 44-47.

5. **Слинина, К.Н. Новый способ деконтаминации образцов патологического материала от животных положительно реагирующих на туберкулин // Журн. Ветеринарная практика. - Санкт-Петербург, 2007. – №1. – С. 19-21.**

6. Слинина, К.Н., Воробьева З.Г., Лазовская А.Л. [и др.] Бактериологическое действие пробиотиков на патогенные микроорганизмы, выделенные от свиней // Материалы научно практической конф. НИВИ НЗ РФ.- Н. Новгород, 2007.- С.129-135

7. Слинина, К.Н. Дезинфицирующие средства при туберкулезе и нокардиоформных актиномицетных инфекциях // Сб. научных трудов НИВИ НЗ РФ. - Н.Новгород, 2008. - С.22-31.

8. Воробьева, З.Г., Лазовская А.Л., Слинина К.Н. Реакция агглютинации латекса для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота// Тезисы докладов Прикаспийский НИВИ. – Махачкала, 1997. – С. 46-47.

9. **Воробьева, З.Г., Лазовская А.Л., Слинина К.Н. Микросферные тесты для диагностики инфекционных заболеваний эукариотов // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук.- М., 1998.- № 4. - С.59-61.**

10. Воробьева, З.Г., Лазовская А.Л., Слинина К.Н. Реакция агглютинации латекса для выявления специфических антител при туберкулезе крупного рогатого скота / Иммунодиагностика и иммунореабилитация при лепре, туберкулезе других хронических заболеваниях // Материалы Симпозиума.- Астрахань, 1998. – С. 77-79.

11. **Лазовская, А.Л., Воробьева З.Г., Слинина К.Н., Исполатов В.А. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота с применением мик-**

росферного теста // Доклады Российской академии с/х наук. – М., 1999.-№ 2. - С. 50-52.

12. Воробьёва, З.Г., Слинина К.Н., Финкельштейн Л.С. Антигены микобактерий в отделяемом лёгких // Журн. Проблемы туберкулёза.- Изд. «Медицина» М., 1999.- № 1.-С. 61\_63.

13. Лазовская, А.Л., Слинина К.Н., Исполатов В.А. Подготовка патологического материала для бактериологического исследования на микобактерии туберкулёза // Тезисы докладов научной конф. - НИВИ НЗ РФ. - Н. Новгород, 1999.- С. 39-40.

14. Воробьёва, З.Г., Лазовская А.Л., Слинина К.Н. Новый лабораторный метод при диагностике крупного рогатого скота // Журн. Аграрная наука Евро-Северо-Востока . - Киров, 2000 – № 1– С. 84-86.

15. Лазовская, А.Л., Воробьёва З.Г., Синицина Н.А., Слинина К.Н. Выявление микобактериальных антигенов в моче с помощью реакции агглютинации латекса //Журн. Проблемы туберкулёза. - Изд. «Медицина» М., 2001. – № 4. – С. 37-38.

16. Лазовская, А.Л., Лопарев П.И., Слинина К.Н. Дезинфектант – продукт переработки древесины сосновых пород // Сб. научных трудов.- НИВИ НЗ РФ – Н.Новгород, 2001. – С. 103-108.

17.Лазовская, А.Л., Слинина К.Н., Воробьёва З.Г., Ильина Е.А. Родококоз у свиней // Сб. научных трудов НИВИ НЗ РФ.- Н.Новгород, 2001.- С.37-48.

18. Леванова, Г.Ф., Лазовская А.Л., Кашников С.Ю., Слинина К.Н. Подход к изучению плазмид у микобактерий // Сб. научных трудов НИВИ НЗ РФ. – Н.Новгород, 2001. – С. 43-46.

19. Воробьёва, З.Г., Лазовская А.Л., Слинина К.Н. Использование специфического латексного диагностикума при туберкулёзе крупного рогатого скота в практике животноводческих хозяйств. // Журн. «БИО». - Екатеринбург, 2002.- С. 2-4.

20.Лазовская, А.Л., Слинина К.Н., Воробьёва З.Г. Новый дезинфектант «Лесептик». // Журн. Практик.- Санкт-Петербург, 2003 № 3-4. – С. 86-88.

21.Лазовская, А.Л., Слинина К.Н., Воробьёва З.Г. Специфическая иммунопрофилактика при туберкулёзе как антропозоонозе // Сб. научных трудов, НИВИ НЗ РФ. - Н.Новгород, 2003. – С. 43-48.

22. Лазовская, А.Л., Слинина К.Н., Воробьёва З.Г. Использование «Лесептика для дезинфекции свиноводческих комплексов // Доклады Российской академии с/х наук. М., 2003. – №1. – С.45-48.

23. Гришин, Г.И., Слинина К.Н. Дар природы «Гумивит». // Журн. Практик. - Санкт-Петербург, 2004, № 3-4). - С. - 80-83.

24. Воробьёва, З.Г., Лазовская А.Л., Слинина К.Н. Экспресс-диагностика туберкулёза крупного рогатого скота //Журн. Ветеринарная патология. – М., 2004. – № 1-2 (9). – С. 126-127.

25. Лазовская, А.Л., Слинина К.Н., Воробьева З.Г., Ким Р.Е. Родоккокковая инфекция у животных // Доклады Российской академии с/х наук.- М., 2004. - № 2 – С. 38-41.

26. Воробьева З.Г., Степаншина В.Н., Лазовская А.Л., Слинина К.Н. Метод рестрикционного анализа для типирования микобактерий // Сб. научных трудов НИВИ НЗ РФ.– Н.Новгород, 2004. – С. 38-42.

27. Лазовская, А.Л., Воробьева З.Г., Слинина К.Н. Генетическое типирование штаммов *M. bovis* // Журн. Ветеринария. - М., 2004. - № 7. – С. 26-29.

28. Воробьева, З.Г., Лазовская А.Л., Слинина К.Н. Новый многокомпонентный дезинфектант «Лесептик» // Сб. научных трудов Уральский НИВИ. РАСХН. Екатеринбург, 2005. – С. 418-423.

29. Лазовская, А.Л., Воробьева З.Г., Слинина К.Н. Новое дезинфицирующее средство «Лесептик» // Брошюра.- НИВИ НЗ РФ. - Н.Новгород, 2005.-27с.

30. Лазовская, А.Л., Слинина К.Н., Воробьева З.Г., Дручкова М.В. Заболевание свиней, вызванное штаммами *Rhodococcus equi* // Материалы Всероссийской научно - практической конф.- Саранск, 2005. – С. 344-346.

31. Лазовская, А.Л., Воробьева З.Г., Слинина К.Н. Методические рекомендации по применению дезинфицирующего средства «Лесептик» в ветеринарной дезинфекции // НИВИ НЗ РФ.- Н.Новгород, 2005.-7с.

32. Воробьева, З.Г., Лазовская А.Л., Слинина К.Н. Среда для культивирования микобактерий и нокардиоформных актиномицетов // Материалы международной научной конференции Ульяновск, 2006.- С.42-46.

33. Лазовская А.Л., Слинина К.Н., Воробьева З.Г., Дручкова М.В., Полуэктов Е.И. // Журн. Проблемы туберкулеза и болезней лёгких.- Изд. «Медицина» М., 2000. – № 8. – С. 50-52.

34. Лазовская, А.Л., Слинина К.Н., Кульчицкая М.А. Антагонистическая активность пробиотиков по отношению к патогенным микроорганизмам, выделенным от больных поросят // Тезисы докладов НИВИ НЗ РФ.– Н.Новгород, 2006. – С. 73-79.

35. Лазовская А.Л., Воробьева З.Г., Слинина К.Н., Кульчицкая М.А. Пробиотики-антагонисты бактериальных патогенов свиноводческого комплекса // Материалы международной конф. - Ульяновск, 2006. – С. 414-417.

36. Лазовская, А.Л., Слинина К.Н., Воробьева З.Г., Дручкова М.А. Полуэктов Е.И. Микобактериоз, вызванный *M. хепорі* у крупного рогатого скота // Журн. Проблемы туберкулеза и болезней лёгких.- Изд. «Медицина» М., 2006. – № 3. – С. 50-52.

37. Лазовская, А.Л., Слинина К.Н., Воробьева З.Г., Дручкова М.В. Обнаружение коринебактерий в патологическом материале. // Журн. Ветеринария. М., 2007. – №2.– С. 23-25.

38. Лазовская, А.Л., Воробьева З.Г., Слинина К.Н., Ильина Е.А. Генетическое типирование штаммов *M. bovis*. // Журн. Ветеринария сельского хозяйства. М., 2007. – №1 – С. 30-32.



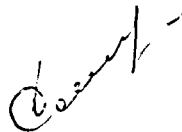
39. **Технические условия** на «Набор для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в реакции агглютинации латекса РАЛ» (ТУ 9388-001-0067433-99 Утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ, Москва, 1999).

40. **Наставление** по применению набора для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в реакции агглютинации латекса (РАЛ) (Утверждены Департаментом ветеринарии МСЗ РФ, Москва, 1999).

41. **Методические рекомендации** по серологической диагностике туберкулеза сельскохозяйственных животных (Утверждены РАСХН, Москва, 1999).

42. **Методические рекомендации** // Новые методы исследования возбудителей антропозоонозов. Туберкулёз (Утверждены РАСХН, Москва, 2003).

43. **Временное наставление** по применению дезинфицирующего средства «Лесептик» (Утверждены Комитетом Госветнадзора администрации Нижегородской области.- Н.Новгород, 2001).



Слинина Клавдия Николаевна

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗА  
И НОКАРДИОФОРМНЫХ АКТИНОМИЦЕТНЫХ ИНФЕКЦИЙ  
(эпизоотология, диагностика, профилактика)

*Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
доктора ветеринарных наук*

Подписано в печать 14.04.2009                      Формат издания 60x84 1/16  
Печ.л. 1,44 Усл.п.л. 1,34      Тираж 100 экз.      Заказ 596

---

Отпечатано в полиграфическом отделе ФГОУ ВПО  
«Ивановская ГСХА имени академика Д.К. Беляева»  
153012, г. Иваново, ул. Советская, 45