

На правах рукописи

КУРМЫШЕВ
Иван Александрович

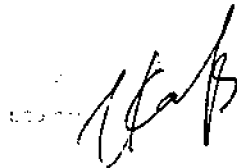
**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПАТОГЕННОСТИ
АТИПИЧНЫХ ШТАММОВ МИКОБАКТЕРИЙ И
НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ НА ТУБЕРКУЛИН, ВЫЗВАННЫХ
КОКЦИДИОИДОМИКОЗОМ**

16.00.02 - патология, онкология и морфология животных

16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук



Казань – 2006

Работа выполнена на кафедрах патологической анатомии и эпизоотологии ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э.Баумана».

Научный руководитель:	доктор ветеринарных наук, профессор Идрисов Газим Зиганшинович
Научный консультант:	доктор ветеринарных наук, профессор Харитонов Михаил Васильевич
Официальные оппоненты:	доктор медицинских наук, профессор Цыплаков Дмитрий Эдуардович
	доктор ветеринарных наук, профессор Садыков Нариман Султанович
Ведущая организация:	ФГОУ ВПО «Омский государствен- ный аграрный университет»

Защита состоится «27» декабря 2006 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д-220.034.01 при ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э.Баумана».

Адрес: 420074, РТ, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 35

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э.Баумана».

Автореферат разослан «25» ноября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.в.н., профессор



Ежкова М.С.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы. Несмотря на то, что с момента открытия Р. Кохом микобактерий туберкулеза прошло более ста лет, это заболевание до сих пор не теряет своей актуальности. Считается, что микобактерией туберкулеза инфицировано около 2/3 населения планеты. Ежегодно активным туберкулезом заражается 8 миллионов человек, из них около 3 миллионов погибает (Васильев Н.А., 1990; Шендерова Р.И., 1992).

Сложность проблемы туберкулеза обуславливается такими факторами, как ubicвитарность или повсеместность этого заболевания в эпидемиологическом, клиническом и морфологическом отношении, двуликость проявления в организме: в зависимости от соотношения иммунитета и аллергии оно может проявляться в виде инфицированности и болезни, а также выраженный полиморфизм клинико-морфологического проявления заболевания и хроническое его течение с чередованием вспышек и ремиссий (Морозов В.А., 1977; Струков А.И., 1977).

Все эти факторы способствовали тому, что в последние годы появилась тенденция широкого распространения туберкулеза среди населения, а также множественные вспышки заболевания среди сельскохозяйственных животных. При этом из биологического материала, полученного от животных, больных туберкулезом и положительно реагирующих на туберкулин, наряду с возбудителем, зачастую выделяются и атипичные микобактерии (Александров Н.А., 1974; Шуревский В.Е., 1984; Созинов В.А., 1996). Эти микроорганизмы, значительно отличаясь по своим культуральным и биохимическим свойствам, могут самостоятельно вызывать сенсibilизацию организма. Атипично протекающие формы туберкулезного процесса в этом случае обуславливаются достаточно широким диапазоном изменчивости самого возбудителя (Хамитова С.А., 2000, 2001). Трансформированные варианты микобактерий, сохраняя свою антигенную специфичность и потенциальную патогенность, могут стать причиной латентно протекающего процесса с различной локализацией. При этом морфологическая верификация диагноза затруднена из-за выраженных неспецифических и аллергических реакций, не свойственных типичной туберкулезной инфекции (Харитонов М.В., 1998, 1999).

Среди множества причин, вызывающих появление неспецифических реакций на введение туберкулина, особое место занимает заражение животных патогенными грибами. Одним из таких заболеваний является кокцидиоидомикоз. В этом случае при диагностическом убое животных, положительно реагирующих на туберкулин, не удастся выявить специфические туберкулезные изменения и выделить возбудителя характерными для туберкулеза методами (Донченко А.С., 1997). Вместе с тем, сходное хроническое течение, наличие в органах очагов поражения, напоминающих туберкулезные, обуславливают необходимость изучения патогенеза и патоморфологии этого заболевания и проведение дифференциальной диагностики его от туберкулеза (Чаусовская М.М. и др., 1971, 1978).

1.2. Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы явилось изучение эпизоотологической ситуации по туберкулезу в Республике Татарстан, оценка патоморфологических изменений в органах животных, обусловленных заражением микобактериями атипичного штамма 55/96 различными способами, а также разработка дифференциальной диагностики туберкулеза животных от кокцидионидомикоза патоморфологическими методами.

Для реализации данной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Проанализировать эпизоотологическую ситуацию в Республике Татарстан в период с 2001 по 2005 годы.

2. Изучить характер и динамику патоморфологических изменений в органах лабораторных животных, зараженных микобактериями атипичного штамма 55/96 различными способами.

3. Провести сравнительную морфологическую оценку различных способов заражения морских свинок и кроликов микобактериями атипичного штамма 55/96 и атипичного штамма *M. smegmatis*.

4. Выяснить возможность образования Л-форм из микобактерий атипичного штамма 55/96 в организме подопытных животных.

5. Изучить характер патоморфологических изменений в органах и тканях животных, больных кокцидионидомикозом, и усовершенствовать его дифференциальную диагностику от туберкулеза.

1.3. Научная новизна. Детально изучены патогенез и уровень повреждающего действия микобактерий атипичного штамма 55/96 на организм лабораторных животных, в зависимости от различных способов инфицирования. Доказана возможность образования Л-форм из микобактерий атипичного штамма 55/96 в организме морских свинок и кроликов. Впервые выяснены механизмы патогенеза и степень проявления патоморфологических изменений у животных, больных и экспериментально зараженных кокцидионидомикозом.

1.4. Теоретическая и практическая значимость работы. Данные о патогенных свойствах атипичного штамма 55/96 и возможности его реверсии в исходный штамм, полученные в ходе исследований, позволят усовершенствовать систему диагностических, профилактических и оздоровительных мероприятий, и в частности, систему контроля над инфицированностью туберкулезом, в том числе атипичными штаммами микобактерий, в неблагополучных хозяйствах. Разработанные патоморфологические критерии дифференциальной диагностики туберкулеза животных от кокцидионидомикоза, которые отражены в методических указаниях, помогут на практике осуществлять четкое разграничение этих заболеваний.

1.5. Апробация материалов диссертации. Материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях кафедры патологической анатомии ФГОУ ВПО «КГАВМ им. Н.Э.Баумана» в виде ежегодных отчетов (2004-2006); на

конференции молодых ученых и специалистов КГАВМ (Казань, 2004); на Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 45-летию ФГНУ «ВНИИ» (Казань, 2005); на Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию образования зооинженерного факультета (Казань, 2005), на Международной научно-практической конференции, посвященной актуальным проблемам ветеринарной патологии и морфологии животных (Воронеж, 2006).

1.6. Публикации результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 9 работ, в числе которых 5 статей и 4 тезиса.

1.7. Внедрение результатов исследований. Утверждены ученым советом факультета ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «КГАВМ» от 25.10.06 (протокол №8) методические указания «Дифференциальная диагностика туберкулеза животных от кокцидионидомикоза патоморфологическими методами».

1.8. Основные положения, выносимые на защиту:

- Различные способы заражения морских свинок и кроликов микобактериями атипичного штамма 55/96 вызывало у них усиление гиперпластически-пролиферативных реакций в иммунокомпетентных органах, без образования эпителиоидно-клеточных гранулем;
- В организме животных микобактерии атипичного штамма 55/96 способны трансформироваться в Л-формы, что не исключает их дальнейшей реверсии в исходный штамм с повышением патогенности;
- Патоморфологические изменения при кокцидионидомикозе имеют сходную с туберкулезом картину, однако различаются по локализации очагов поражения в легких, скорости прогрессирования некротических изменений, слабо выраженной организации очагов некроза и частоте поражения кожи и подкожной клетчатки при кокцидионидомикозе.

1.9. Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 156 страницах и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов собственных исследований, выводы, практические предложения, библиографический список использованной литературы (192 источников, в том числе 133 наименования работ отечественных и 59 иностранных авторов) и приложения. Диссертация иллюстрирована 54 фотографиями.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа является частью комплексных исследований, проводимых по заданию ГУВ РТ кафедрой эпизоотологии по изучению природы ложноположительных реакций животных на туберкулин и патогенности измененных форм микобактерий туберкулеза, в период с 2004-2006 годы согласно государствен-

ному плану научных исследований. Для выполнения работы проводились совместные научно-производственные опыты с сотрудниками кафедры эпизоотологии и Республиканской ветеринарной лаборатории ГУВ РТ.

В работе были использованы 44 беспородных морских свинки в возрасте 6-8 месяцев и 22 кролика породы «серый великан» 12-16 месячного возраста, а также материал, взятый от 11 коров, положительно реагировавших на туберкулин, 9 из которых были больны кокцидиомикозом. Было проведено 3 серии опытов, которые включали в себя 7 групп животных, подобранных по принципу аналогов.

Штаммы и культуры: 1) *Mycobacterium* 55/96 - атипичный штамм, полученный на каф. эпизоотологии путем длительного культивирования вирулентного штамма микобактерий № 14 при температуре 52°C; 2) *Mycobacterium smegmatis* - штамм, полученный из ВГНКИСС и выделенный на каф. эпизоотологии из шт. № 312 и № 34; 3) культура стабильных Л-форм микобактерий, полученная на каф. эпизоотологии из патматериала от крупного рогатого скота из длительно неблагополучных хозяйств; 4) культура гриба *Coccidioides immitis*, выделенная из органов крупного рогатого скота, больного кокцидиомикозом, полученная из РВЛ ГУВ РТ.

Для изучения патогенных свойств атипичного шт. 55/96 в зависимости от способа заражения возбудитель вводили животным тремя разными способами (внутрикожный, подкожный и внутрибрюшинный). Доза заражения составляла 30 мг на одно животное. В первом случае возбудитель инокулировали путем внутрикожного введения культуры штамма 55/96 в область боковой стенки живота. При втором способе животных заражали в область паха. В третьем случае инфицирование животных проводилось интраперитонеально культурой возбудителя, суспендированной в 5 мл стабилизированной крови крупного рогатого скота.

Контролем служило интраперитонеальное заражение животных штаммом *M. smegmatis* в дозе 30 мг. Убой животных проводился через 30 и 45 дней после инфицирования. Критерием убоя служило отсутствие положительной реакции на введение туберкулина для млекопитающих.

Во второй серии опытов нами проводилось изучение возможности трансформации микобактерий атипичного шт. 55/96 в Л-формы. Персистирующие Л-формы обнаруживали в тканях с помощью метода Мурахаси, рекомендованного для выявления кислотоупорных микобактерий лепры. Для сравнительного анализа полученных результатов проводили контрольное заражение морских свинок культурой стабильных Л-форм микобактерий, полученных на каф. эпизоотологии ФГОУ ВПО «КГАВМ» интраперитонеальным методом в дозе 1 мл. Убой животных проводили спустя 1, 2, 3 месяца с момента заражения.

В третьей серии опытов мы проводили исследование органов и тканей от крупного рогатого скота, больного кокцидиомикозом, с целью патоморфологической дифференциации его от туберкулеза. Для контроля и сравнительного анализа полученных результатов проводилось контрольное заражение лабораторных животных культурой гриба *Coccidioides immitis*, полученной в РВЛ

ГУВ РТ. Животные были инфицированы интритрибрюшинным методом в дозе 1000 клеток суспензии артроспор культуры возбудителя для морских свинок и 10000 клеток для кроликов. Убой животных производили через 1 и 2 месяца с момента заражения. Животных усыпляли с помощью эфирного наркоза.

Материалом для проведения гистологических, патоморфологических и гистохимических исследований служили кусочки регионарных и контррегионарных лимфоузлов, селезенки, тимуса, печени, почек, миокарда, легких, надпочечников подопытных животных. Кусочки органов, взятые от животных, фиксировали в 10 % нейтральном формалине по Беккеру, спирт-формоле, в холодном этаноле. Уплотнение патматериала проводили путем заливки в парафин по общепринятой методике (Меркулов Г.А., 1969) и замораживанием в криостате углекислотой.

Гистологические срезы толщиной 6-7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, по Ван-Гизону, азур-эозином. Содержание РНК определяли по Браше, ДНК - по Фельгену, нейтральные полисахариды - ШИК - реакцией по Мак-Манусу, на липиды - суданом черным.

Для выявления Л-форм гистосрезы окрашивали по методике Мурахаси, что позволило выявить Л-формы микобактерий туберкулеза в структурах тканей инфицированных животных. Микрофотографирование проводили с помощью фотоаппарата SONY DSC-W17.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Эпизоотологическая ситуация по туберкулезу крупного рогатого скота в Республике Татарстан

При анализе эпизоотологической ситуации по туберкулезу крупного рогатого скота за последние пять лет (с 2001 по 2005 годы) из $1116 \pm 20,36$ имеющихся в республике различных форм хозяйств в 346 (31%) были выявлены реагиовавшие на туберкулин животные в количестве 20048 голов. Из числа реагиовавших животных 13291 (66,3%) были подвергнуты контрольно-диагностическому убою, лабораторным же исследованиям подвергались 4130 проб биоматериала. В результате за отчетный период из всего исследованного биоматериала в 60 (1,4%) случаях были выделены микобактерии туберкулеза повышенной вирулентности. При этом наибольшее число (69%) вспышек заболевания наблюдалось в местностях, где ранее инфекция не регистрировалась. Полученные данные не позволяют говорить о полном благополучии Республики Татарстан по туберкулезу. Однако ситуация полностью стабилизировалась и наблюдается стойкая тенденция к уменьшению случаев возникновения заболевания.

3.2. Изучение патоморфологии органов и тканей морских свинок и кроликов, зараженных атипичным штаммом микобактерий 55/96

В литературе имеются сообщения о выделении из биологического материала реагирующих на туберкулин животных потенциально патогенных микобактерий. Эти микобактерии по своим культуральным и биохимическим свойствам отличаются от микобактерий туберкулеза. Они слабо патогенны для морских свинок и обладают естественной лекарственной устойчивостью к большинству противотуберкулезных препаратов.

Было установлено, что атипичные микобактерии могут не только выделяться наряду с вирулентными от больных туберкулезом, но и самостоятельно вызывать сенсибилизацию организма. Изучение патоморфологических изменений, вызванных атипичными микобактериями, позволит усовершенствовать систему диагностических мероприятий при латентно протекающей туберкулезной инфекции.

3.2.1. Патоморфологические изменения в организме животных при различных способах заражения микобактериями атипичного штамма 55/96

Для постановки данного исследования подопытные животные были разделены на следующие группы:

1-ая группа – 6 морских свинок и 4 кролика, инфицированных внутрикожно в дозе 30мг нативной культуры штамма 55/96, разведенной в 0,2 мл физиологического раствора в область лопатки.

2-ая группа – 6 морских свинок и 4 кролика, инфицированных подкожно в дозе 30мг в области паха.

3-я группа – 6 морских свинок и 4 кролика, инфицированных внутрибрюшным способом микробной культуры, суспендированной в 5 мл стабилизированной крови крупного рогатого скота.

4-я группа – контрольная – 6 морских свинок и 4 кролика, инфицированных культурой *M. smegmatis* внутрибрюшинным способом, аналогично предыдущей группе.

Опытные и контрольная группы были подобраны по принципу аналогов. За животными вели наблюдение до утраты аллергических реакций, которые контролировали периодическим проведением симультанной аллергической пробы с туберкулином для млекопитающих и комплексным аллергеном из атипичных микобактерий.

Подопытные животные были убиты через 30-45 дней после заражения, по мере утраты аллергических реакций на туберкулин для млекопитающих.

Патоморфологические изменения в органах подопытных животных характеризовались развитием гемодинамических расстройств, выраженным проявлением гиперпластически - пролиферативных процессов в лимфоидной ткани и активацией мезенхимных элементов во внутренних органах. Эти изменения были более выражены при внутрибрюшинном способе заражения, что

связано с большей зоной контакта возбудителя с макроорганизмом и хорошей всасывательной функцией брюшины. В регионарных к месту введения микобактерий лимфоузлах развивались следующие изменения: органы несколько увеличены в объеме, рисунок фолликулярного строения выражен. Фолликулы их имели расширенные герминативные центры, в которых обнаруживались бластные клетки в различных стадиях митотического деления, единичные макрофаги, а также малые и средние лимфоциты. Мякотные шнуры были утолщены и содержали значительное количество плазмочитов разной степени зрелости. Последнее служит морфологическим проявлением иммунологической перестройки организма и показателем антителообразования в организме. Также наблюдался лимфоцитоз синусов. Маргинальная зона фолликулов имела разреженное расположение клеточных элементов, что свидетельствовало об их ускоренном поступлении в кровяное русло. Стенки артериол, венул и капилляров нередко находились в состоянии мукоидного набухания.

Селезенка незначительно увеличена в размере, рисунок фолликулярного строения выражен. Отмечалась гиперплазия лимфоидной ткани периаартериальных гильз и обеднение клеточными элементами мантийной зоны. Венозные синусы были расширены, содержали значительное количество синусных макрофагов и единичные малые и средние лимфоциты. Число сидерофагов, загруженных гемосидерином, несколько увеличено. По ходу трабекул местами выявлялись небольшие скопления плазмочитов разной степени зрелости, обогащенных РНК. Стенки сосудов микроциркуляции были утолщены, гомогенизированы, эндотелий их пикноморфен. Ретикулярная основа органа огрубевшая.

В печени сохранялся рисунок дольчатого и балочного строения. Междольковые, собирательные и центральные вены были кровенаполнены и растянуты. В периваскулярной соединительной ткани выявлялись очаговые пролифераты лимфоидно-гистиоцитарных клеток. Эндотелий внутريدольковых капилляров умеренно пролиферовал, печеночные клетки были с явлениями зернистой дистрофии. Среди гепатоцитов заметно увеличение числа клеток, имеющих диплоидные и гиперхромные ядра.

В почках рисунок строения сохранялся, почечные клубочки в основном имели одинаковые размеры, капилляры в них были неравномерно налиты, что говорит о проявлении гемодинамических расстройств в органе. Следует отметить, что базальная мембрана капилляров была неравномерно утолщена. Между капсулой Шумлянского-Боумана и сосудистым клубочком отмечалось скопление отечной жидкости. Капилляры органа расширены, полнокровны, местами как в корковом, так и в мозговом веществе встречались очаговые геморрагии. Эпителий канальцев с явлениями зернистой дистрофии. Стенки отдельных сосудов находились в состоянии мукоидного набухания.

В миокарде сохранился рисунок волокнистого строения, интерстициальная ткань отечная, кардиомиоциты с явлениями белковой дистрофии. В толще органа местами выявлялись очаговые пролифераты мононуклеарных клеток. Нервно-мышечные волокна миокарда содержали незначительное количество гликогена, в целом же по органу его содержание было неравномерным.

В легких сохранялся рисунок строения, в перибронхиальной соединительной ткани обнаруживались значительных размеров компактные скопления лимфоидной ткани, нередко с формированием герминативных центров. Наряду с сохранившейся неизменной легочной тканью обнаруживаются фокусы дистелектаза и ателектаза с утолщением межальвеолярных перегородок. В местах утолщения отмечалась инфильтрация лимфоидно-гистиоцитарными клетками, а также расширение и кровенаполнение капилляров. Эпителий крупных бронхов набухший, местами слушен, подслизистая ткань была отечна и содержала небольшое количество моноклеарных клеток. Сосуды артерио-венозных анастомозов находились в состоянии расширения, или контрактуры.

В надпочечниках отмечалось расширение коркового слоя органа за счет гиперплазии клеток пучковой и сетчатой зон, а также очаговой гиперплазии клеток клубочковой зоны. В последней обнаруживались очаги гиперплазии клеток в виде отдельных железистых структур. Эти явления можно квалифицировать как функциональное напряжение органа, возникшее в результате антигенной нагрузки. Как в пучковой, так и в сетчатой зоне отмечались явления зернистой дистрофии эпителиальных клеток с пикноморфностью их ядер.

Рисунок дольчатого строения тимуса хорошо выражен. Число телец Гассала уменьшено, единичные их экземпляры обнаруживались в мозговом веществе и на границе между слоями. В подкапсулярной зоне органа наблюдалось плотное расположение тимоцитов, среди которых заметно увеличение числа фигур митоза. В средней зоне коркового слоя плотность расположения тимоцитов снижалась. Мозговое вещество было представлено, в основном, ретикулоэпителиальными клетками с небольшим числом эозинофилов с достаточно хорошо выраженной зернистостью. Сосуды кортико-медуллярного стыка умеренно расширены и содержали единичные тимоциты. Подобные изменения в тимусе служат доказательством ускоренного созревания Т-лимфоцитов и поступления в кровоток их незрелых форм.

Развитие гиперпластически-пролиферативных процессов в лимфоидных органах свидетельствует о сохранении иммуногенных качеств атипичного штамма 55/96. Проллиферативные явления, а также активация мезенхимных элементов, по-видимому, связаны с иммунологической перестройкой организма. Явления зернистой дистрофии, а также появление очаговых геморрагий в почках, по-видимому, обусловлены определенной токсичностью вводимого антигена.

3.2.2. Патоморфологические изменения в органах и тканях лабораторных животных, экспериментально зараженных микобактериями атипичного штамма *M. smegmatis*

Для контроля и сравнительного анализа полученных результатов при различных способах инфицирования животных микобактериями атипичного штамма 55/96 нами было проведено заражение морских свинок культурой микобактерий из штамма *M. smegmatis*. Для этого использовали 6 морских свинок

живой массой 250-300 грамм и 4 кролика живой массой 2-2,5 кг. Введение инфекта осуществляли интраперитонеальным методом. При исследовании органов и тканей животных, убитых на 30-45 суток после заражения наиболее характерные патоморфологические изменения были обнаружены в печени, селезенке, лимфоузлах, легких, почках и миокарде.

В печени рисунок дольчатого и балочного строения сохранился. Сосуды микроциркуляции умеренно налиты, в междольковой и периваскулярной соединительной ткани выявлялись очаговые скопления мононуклеарных клеток. Желчные протоки - в состоянии спазма, в их подслизистой оболочке обнаруживались единичные мононуклеарные клетки. Окружающая желчные протоки соединительная ткань отечная, разволокнена и содержала единичные лимфоидно-гистиоцитарные клетки. Местами в паренхиме органа отмечались единичные кровоизлияния. Гепатоциты с явлениями зернистой дистрофии, среди них заметно было увеличение числа клеток, имеющих гиперхромные и диплоидные ядра.

В селезенке рисунок фолликулярного строения был выражен. Некоторые фолликулы имели расширенные герминативные центры. Лимфоидная ткань периартериальных гильз умеренно гиперплазирована, с образованием в ней фолликулов с герминативными центрами. В герминативных центрах обнаруживалось незначительное количество бластных клеток и фигур митоза. Венозные синусы расширены, в них, кроме эритроцитов, отмечалось значительное количество малых и средних лимфоцитов и зернистых лейкоцитов. Заметно увеличение числа сидерофагов, загруженных гемосидерином. По ходу сосудов и трабекул отмечались небольшие скопления плазмочитов, представленных в основном зрелыми формами. Значительные скопления плазмочитов разной степени зрелости обнаруживались также в красной пульпе органа. Стенки мелких сосудов утолщались, эндотелий их набухший, местами слущивался. Ретикулиновая основа органа несколько огрубевшая.

Лимфатические узлы в объеме не увеличивались. При гистологическом исследовании отмечали незначительное расширение герминативных центров фолликулов, некоторую гиперплазию лимфоидной ткани и инфильтрацию мякотных тяжей клетками плазмочитарного ряда. Отдельные сосуды лимфоузла были с явлениями слущивания эндотелия, их мозговые синусы расширены и содержали небольшие скопления лимфоцитов и синусных макрофагов.

Легкие были неспавшиеся, воздушны, светло-красного цвета. При гистологическом исследовании обнаруживались фокусы дистелектаза и ателектаза с утолщением межальвеолярных перегородок. В местах утолщения отмечалась инфильтрация их лимфоидно-гистиоцитарными клетками, а также расширение и кровенаполнение капилляров. Эпителий крупных бронхов был набухший, местами слущен, подслизистая ткань отечна и содержала небольшое количество мононуклеарных клеток. Сосуды артерио-венозных анастомозов в состоянии расширения. Количество альвеолярных макрофагов, как в сохранившихся участках легких, так и в местах ателектазов и дистелектазов, незначительно.

В почках при гистологическом исследовании отмечались явления зернистой дистрофии эпителия почечных канальцев, выраженное полнокровие органа, а также очаговые пролифераты лимфоидно-гистиоцитарных клеток в корковом веществе. Сосудистые клубочки были приблизительно одинакового размера.

В миокарде рисунок волокнистого строения сохранился, межмышечная соединительная ткань умеренно отекая. Кардиомиоциты были с явлениями зернистой дистрофии.

Как показали наши исследования, патоморфологические изменения, вызываемые микобактериями шт. *M. smegmatis*, сходны с таковыми при инфицировании штаммом 55/96, однако менее выражены. Это говорит о значительном снижении патогенных качеств у микобактерий из шт. *M. smegmatis*.

3.3. Патоморфология органов и тканей, вызванная Л-формами микобактерий

Говоря об измененных штаммах микроорганизмов, исследователи часто задаются вопросом, насколько стабилен данный вид, не способен ли он трансформироваться в дальнейшем, и не может ли он реверсировать в свой первоначальный вариант. Как известно, одним из видов изменчивости многих бактерий является образование Л-форм. Доказана способность к их образованию и у микобактерий туберкулеза. При этом минимальная метаболическая активность и пониженная антигенная функция позволяют им избегать или значительно снижать иммунологическое воздействие макроорганизма. Все это создает предпосылки для длительной персистенции Л-форм и потенциальной опасности возникновения спонтанного туберкулеза. Поэтому бессимптомное течение туберкулеза с возникновением вспышек заболевания в благополучных по этому заболеванию хозяйствах диктует насущную необходимость установления возможности Л-трансформации у атипичных штаммов. Таким образом, в наших исследованиях преследовалась цель установить возможность трансформации микобактерий атипичного штамма 55/96 в Л-формы в организме подопытных животных.

3.3.1. Образование Л-форм в организме животных, инфицированных микобактериями атипичных штаммов

Для проведения исследования использовались кусочки органов и тканей морских свинок и кроликов, инфицированных микобактериями атипичного штамма 55/96. Для обнаружения персистирующих Л-форм микобактерий в тканях мы применяли метод Мурахаси, рекомендованный для выявления кислотоупорных бактерий лепры. Для контроля и сравнительного анализа была составлена группа животных (морских свинок и кроликов), зараженных культурой стабильных Л-форм микобактерий.

В результате проведенных исследований нами было обнаружено наличие Л-форм микобактерий в легких, печени, почках, селезенке и лимфатических узлах подопытных животных через 30 дней после заражения, независимо от способов инфицирования. Количество Л-форм микобактерий через 45 дней с момента заражения в органах и тканях животных увеличилось незначительно.

В лимфатических узлах Л-формы микобактерий располагались среди скоплений плазмочитов и имели вид округлых образований ярко-зеленого цвета. Единичные образования обнаруживались также в межфолликулярной ткани органа.

В селезенке полиморфные варианты Л-форм микобактерий обнаруживались в красной пульпе органа среди скоплений плазматических клеток.

В легких гетероморфные формы Л-форм микобактерий выявлялись в просвете альвеол, бронхиол и междольковой соединительной ткани. Причем количество Л-форм в легких было значительно выше, чем в других органах. Таким образом, легкие являются основным местом трансформации и депонирования Л-форм микобактерий, с последующим поступлением их в циркуляторное русло и распределением в другие органы.

В печени, почках и миокарде обнаруживали зернистую дистрофию. В печени единичные Л-формы микобактерий выявлялись в просвете внутридольковых капилляров. В почках в просвете между боуменовых капсулой и сосудистым клубочком содержалось значительное количество отечной жидкости, здесь же обнаруживались единичные полиморфные варианты Л-форм.

По результатам исследований можно сделать вывод, что микобактерии атипичных штаммов способны в организме подопытных животных трансформироваться в Л-формы. В связи с этим существует вероятность реверсии Л-форм в исходный штамм, из которого был получен атипичный штамм 55/96. Это может произойти вследствие ослабления резистентности организма, действия каких либо стрессовых факторов, а также в результате иммунологической перестройки организма.

3.4. Дифференциальная диагностика туберкулеза животных от кокцидиодомикоза

Давно известно сходство кокцидиодомикоза с туберкулезом. С этим связаны большие трудности при проведении дифференциальной диагностики этих болезней. При обоих заболеваниях первичное инфицирование связано с аэрогенным путем заражения, которое в большинстве случаев протекает бессимптомно и заканчивается самоизлечением. Определенную трудность при дифференциации этих заболеваний составляет и то, что, являясь хроническим заболеванием, кокцидиодомикоз вызывает сходные с туберкулезом патологические изменения. Таковыми являются: выраженный тропизм возбудителей этих заболеваний к легочной ткани, определенное сходство по форме и клеточному составу гранул, наличие периодов обострения и затухания, локализация внелегочных поражений. Целью нашего исследования явилось установление

патоморфологических критериев для дифференциальной диагностики этих заболеваний.

3.4.1. Патоморфологические изменения в органах и тканях животных, больных кокцидиомикозом

Нами было проведено патоморфологическое исследование органов и тканей 11 голов крупного рогатого скота, из которых 9 оказались больными кокцидиомикозом. У больных животных наблюдалось некоторое угнетение общего состояния, но аппетит сохранялся. Температура тела была в пределах нормы или незначительно повышена. Дыхательные движения и пульс несколько учащены. У четырех коров в подкожной клетчатке обнаруживались округлые плотные образования величиной с лесной орех, болезненные на ощупь. При диагностическом убое эти образования имели на разрезе серовато-желтый вид, окружающая их подкожная клетчатка отечная, усеяна мелкоточечными кровоизлияниями.

Легкие были неспавшиеся, как с поверхности, так и на разрезе окрашены неравномерно, у тупого края диафрагмальных долей выявлялись различной величины очаги уплотнения, имеющие серовато-красную окраску с более светлым участком в центре. Величина очагов варьировала от горошины до лесного ореха. При гистологическом исследовании кусочков с пораженных участков обнаруживались различной величины очаги некроза, окруженные лимфоидно-гистиоцитарными клетками, с примесью большого количества эозинофилов и лейкоцитов. Нередко по периферии очагов некроза выявлялись клетки типа макрофагов и многоядерных гигантских клеток. Вокруг некротических фокусов, а также в местах скопления воспалительного инфильтрата обнаруживались сферулы возбудителя, имеющие ярко-красную окраску при ШИК-реакции.

В подкожной клетчатке и прилегающей к ней скелетной мускулатуре при гистологическом исследовании обнаруживали очаги некроза различных размеров, окруженные полиморфноядерными лейкоцитами, эпителиоидными и молодыми соединительнотканными клетками. В центре некротических фокусов находились распавшиеся мышечные волокна с осколками ядер и миофибрилл, образующие однородный детрит. По периферии таких очагов располагались скопления эпителиоидных, лимфоидных клеток и значительное количество эозинофилов. При затяжном течении некротические очаги подвергались обызвествлению. Мышечные волокна, граничащие с очагами некроза, теряли продольную и поперечную исчерченность и находились в состоянии фуксинофильной дистрофии. Здесь же выявлялись сферулы и споровые формы возбудителя.

Лимфатические узлы реагировали усилением гиперпластических процессов в лимфоидной ткани в виде расширения герминативных центров фолликулов, утолщения мягкотных тяжей и опустошением клеточных элементов в перифолликулярной зоне. При наличии очагов поражения в легких наиболее выраженная реакция проявлялась в бронхиальных и средостенных лимфоузлах. В

случае появления очагов в подкожной клетчатке реагировали регионарные лимфатические узлы, что доказывает наличие лимфогенного пути распространения инфекции.

3.4.2. Патоморфологические изменения в органах и тканях животных, экспериментально зараженных кокцидиондомикозом

Анализ эпизоотологических данных и клинического материала показывает, что животные в неблагополучных по кокцидиондомикозу хозяйствах заражаются преимущественно аэрогенным путем, а также через поврежденные кожу и слизистые. Вместе с тем, в литературе отсутствуют данные, связанные с раскрытием механизмов этого процесса у животных и определением его роли в развитии инфекции. Мы провели изучение патогенеза экспериментального кокцидиондомикоза, вызванного однократным заражением морских свинок и кроликов культурой гриба *Coccidioides immitis*, полученной из ГУВ РТ. Подопытные животные были инфицированы однократно внутрибрюшинно в дозе 1000 клеток суспензии артроспор для морских свинок и 10000 для кроликов. В дальнейшем по 3 морские свинки и 2 кролика убивали через 30, 45, 60 дней после заражения. Контрольные группы составляли интактные животные. Сферулы грибка, а также его споровые формы в тканях выявляли ШИК-реакцией по Мак-Манусу и окрашиванием суданом черным, а также азур-эозином. Морфологические исследования проводились на парафиновых и криостатных срезах тканей с применением гистологических и гистохимических методов окраски. Причем для выявления сферул и споровых форм возбудителя наиболее пригодным оказался метод ШИК-реакции по Мак-Манусу, рекомендованный для выявления гликогена в тканях.

На всех сроках наблюдения у зараженных животных выявлялись признаки разлитого гнойного перитонита, плеврита, а в некоторых случаях казеозное поражение серозных покровов.

Начиная с 30 дней с момента заражения в брюшине, брыжейке и сальнике животных наблюдались серовато-белые узелки, сливающиеся в конгломераты различных размеров. Органы брюшной полости (желудок, печень, селезенка, поджелудочная железа) были окружены плотной серовато-белой тканью, спаяны между собой, неподвижны.

Таким образом, в ходе проведенного исследования нами обнаружено, что при внутрибрюшинном заражении морских свинок и кроликов культурой гриба *Coccidioides immitis* у животных возникает генерализованный инфекционный процесс с поражением внутренних органов и тканей животных. При этом кокцидиондный гриб вначале поражает серозные покровы, локализуясь в брюшине, брыжейке, сальнике, демонстрируя мультицентричный характер первичных очагов. В дальнейшем возбудитель из первичных очагов распространяется в организме гематогенным, лимфогенным путями и по межклеточным пространствам. По мере созревания сферулы гриба в очагах поражения окружаются мононуклеарными клетками и фибробластами, формирующими гранулемы. Однако

полной организации очагов поражения, то есть локализации возбудителя. не происходит, и он продолжает распространяться по организму.

4.ВЫВОДЫ

1. Микобактерии атипичного штамма 55/96 сохраняют свойства стимулировать аллергическую перестройку макроорганизма по типу гиперчувствительности замедленного типа, но не обладают способностью вызывать образование характерных для туберкулеза эпителиоидно-клеточных гранул.

2. При различных способах введения лабораторным животным микобактерий атипичного штамма 55/96 у них развивались гиперпластически-пролиферативные процессы в лимфоидной ткани, гемодинамические расстройства и макрофагально-клеточная реакция во внутренних органах, наиболее выраженные при интраперитонеальном способе, что связано с хорошей всасывательной функцией брюшины и быстрым попаданием возбудителя во внутреннюю среду организма.

3. Микобактерии атипичного штамма 55/96 трансформируются в Л-формы в организме животных, что не исключает их дальнейшей реверсии в исходный штамм с повышением патогенности.

4. Окрашенные по методу Мурахаси Л-формы микобактерий выявляются в органах и тканях преимущественно в виде сферических образований ярко-зеленого цвета. Основным местом трансформации и депонирования Л-форм микобактерий в организме являются легкие.

5. У больных кокцидиондомикозом животных развиваются патологоанатомические изменения, сходные с таковыми при туберкулезе, и у них возникают неспецифические реакции на туберкулин.

6. В отличие от туберкулеза, при кокцидиондомикозе чаще поражается кожа и подкожная клетчатка, очаги поражения в легких характеризуются более быстрым прогрессированием, меньшей степенью организации и преимущественной локализацией в днафрагмальных долях легких.

7. Экспериментальное внутрибрюшинное заражение подопытных животных культурой гриба *Coccidioides immitis* вызвало у них развитие разлитого гнойного перитонита с мультицентричным расположением очагов поражения в брюшине, брыжейке и сальнике.

8. При экспериментальном заражении лабораторных животных установлено, что возбудитель кокцидиондомикоза распространялся в организме гематогенным и лимфогенным путями, а также по межклеточным пространствам, о чем свидетельствовало наличие вторичных очагов поражения в легких, печени и других органах.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. По результатам проведенных исследований разработаны методические указания «Дифференциальная диагностика туберкулеза животных от кокцидиоидомикоза патоморфологическими методами», утвержденные ученым советом факультета ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «КГАВМ». Данные методические указания позволят эффективнее осуществлять мероприятия по диагностике и профилактике этих заболеваний.

2. На основании установленной в организме животных трансформации микобактерий атипичного штамма 55/96 в Л-формы, не исключающей их дальнейшей реверсии в исходный штамм, рекомендуется строгое соблюдение ветеринарно-санитарных мероприятий в отношении положительно реагирующих на туберкулин животных, как возможных носителей атипичных микобактерий.

3. Для обнаружения и изучения морфологических признаков возбудителя кокцидиоидомикоза в органах и тканях животных рекомендуется окраска гистосрезов ШИК – реакцией по Мак-Манусу.

4. Материалы диссертации могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах патанатомии и эпизоотологии, при составлении учебной и методической литературы.

6. СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Курмышев, И.А. Патоморфология органов животных, вызванная штаммом микобактерий 55/96 / Курмышев И.А. // Материалы конференции молодых ученых и специалистов КГАВМ: Тез.докл. – Казань, 2004. – С.34-35.
2. Курмышев, И.А. Патоморфология органов животных, вызванная атипичным штаммом микобактерий / Курмышев И.А. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 45-летию ФГНУ ВНИВИ. – Казань, 2005. – С.313-317.
3. Курмышев, И.А. Патоморфологический контроль патогенности микобактерий штамма 55/96 / Курмышев И.А. // Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию образования зооинженерного факультета: Тез.докл. – Казань, 2005. – С.27-28.
4. Курмышев, И.А. Л-формы микобактерий и проблемы патогенеза туберкулеза / Курмышев И.А., Бехтер М.Г. // Ветеринарный врач. – 2005. – № 4. – С.31-34.
5. Курмышев, И.А. Дифференциальная диагностика туберкулеза крупного рогатого скота от кокцидиомикоза / Курмышев И.А., Идрисов Г.З., Бехтер М.Г., Харитонов М.В. // Сб. статей «Ветеринарная медицина домашних животных». – Вып. 2. – Казань, 2005. – С.52-55.
6. Курмышев, И.А. Патоморфология и патогенез кокцидиомикоза крупного рогатого скота / Курмышев И.А. // Материалы конференции молодых ученых и специалистов КГАВМ: Тез.докл. – Казань, 2006. – С.43-44.
7. Курмышев, И.А. Измененные формы микобактерий и некоторые вопросы патогенеза туберкулеза / Курмышев И.А. // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной патологии и морфологии животных». – Воронеж, 2006. – С.322-327.
8. Курмышев, И.А. Образование Л-форм в органах и тканях животных, зараженных атипичными штаммами микобактерий / Курмышев И.А. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции: Тез.докл. – Казань, 2006. – С.28-30.
9. Курмышев, И.А. Патоморфологическая оценка патогенности атипичного штамма микобактерий 55/96 / Курмышев И.А. // Ученые записки КГАВМ. – 2006. – Т.186. – С.135-139.

*Отпечатано в ООО «Печатный двор».
г. Казань, ул. Журналистов, 1/16, оф. 207
Тел.: 272-74-59, 541-76-41, 541-76-51.
Лицензия ПД №7-0215 от 01.11.2001 г.
Выдана Поволжским межрегиональным
территориальным управлением МПТР РФ.
Подписано в печать 24.11.2006 г. Усл. п. л. 1,0.
Заказ № К-5641. Тираж 100 экз. Формат 60х84 1/16.
Бумага офсетная. Печать - ризография.*