

На правах рукописи

Толстенко Нина Гавриловна

**Патогенные свойства некоторых видов микобактерий,
выделенных от животных и объектов внешней среды**

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

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



Москва - 2006

Работа выполнена в лаборатории микобактериозов Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко Российской академии сельскохозяйственных наук

Научные руководители :

- доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации Овдиенко Николай Павлович
- кандидат медицинских наук Аникин Вячеслав Александрович

Официальные оппоненты : доктор ветеринарных наук, профессор
Бурлаков Валентин Александрович,
кандидат ветеринарных наук
Таранова Людмила Алексеевна

Ведущая организация – ФГУ Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов

Защита состоится « 27 » сентября 2006г. в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко по адресу: 109428, Москва, Рязанский проспект, 24, корп.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВИЭВ

Автореферат разослан « 24 » августа 2006г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
профессор



Н.П.Овдиенко

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы. Одной из ведущих, наиболее сложных и экономически значимых проблем в инфекционной патологии животных является туберкулез. В начале XXI века эпизоотическая обстановка в России, несмотря на тенденцию улучшения в целом, остается напряженной. Экономический ущерб от туберкулеза крупного рогатого скота за последние 45 лет в Российской Федерации превысил 85 млрд.рублей, при этом животноводческая отрасль потеряла около 6 млн. голов крупного рогатого скота, 25,3 млн.тонн молока, 1,6 млн. тонн мяса и 3,5 млн. голов приплода (Ю.И.Смолянинов, 2005).

Решающая роль в системе противозпизоотических мероприятий при туберкулезе животных принадлежит диагностике. Методы и средства диагностики туберкулеза достаточно разнообразны, разработка и совершенствование их продолжается со времен открытия возбудителя.

Основным методом выявления зараженных возбудителем туберкулеза животных является внутрикожная туберкулиновая проба. В некоторых стадах при убое реагировавших на туберкулин животных обнаруживают туберкулезоподобные патологические изменения. В таких случаях эпизоотический статус хозяйства определяется по результатам бактериологического исследования биоматериала от реагировавших на туберкулин животных (Н.П.Овдиенко, А.Х.Найманов, В.А.Ведерников, 2002).

При бактериологическом исследовании с использованием биопробы у морских свинок иногда обнаруживают незначительные узелковые изменения, которые затрудняют определение вида возбудителя туберкулеза. Некоторые исследователи склонны объяснять возникновение таких изменений у морских свинок с инфицированностью животных нетуберкулезными (атипичными) микобактериями, роль которых в патологии человека, сельскохозяйственных и лабораторных животных недостаточно изучена.

По данным разных авторов (Н.М.Макаревич, 1973, 1982; Т.Ф.Оттен, А.В.Васильев, 2005; P.T.Davidson, 1989 ; R.J.Wallace et al., 1990; E.Wolinsky, 1992 и др.), от 10 до 24 видов нетуберкулезных микобактерий являются потенциальными возбудителями микобактериоза человека.

Многие отечественные исследователи (А.С.Донченко и соавт.,1987 ; В.С.Федосеев и соавт., 1988 ; Ю.А.Макаров,1997, Н.И.Прокопьева ,2004, и др.) считают , что нетуберкулезные микобактерии обуславливают только сенсбилизацию крупного рогатого скота к туберкулину для млекопитающих. Некоторые исследователи (О.В.Мартма, 1982; Н.П.Овдиенко и соавт., 1991) выявляли у реагировавшего на туберкулин крупного рогатого скота туберкулезоподобные изменения лимфатических узлов.

Патогенность разных видов нетуберкулезных микобактерий для животных остается пока невыясненной и дискуссионной.

Т.Ф.Оттен (2005) отмечает, что у людей, больных микобактериозом, со временем выявляют туберкулез. Такие же данные имеются и при исследованиях поголовья крупного рогатого скота.

Повсеместно накапливающиеся наблюдения об одновременном выделении возбудителя туберкулеза и нетуберкулезных микобактерий ставят актуальную задачу углубленного изучения патогенных свойств разных видов микобактерий, выделенных от разных видов животных.

1.2Целью исследований являлось изучение культурально-морфологических, биохимических и патогенных свойств микобактерий, выделенных от разных видов животных и объектов внешней среды.

1.3 Основные задачи исследований:

- выяснить частоту выделения микобактерий из объектов внешней среды, от крупного рогатого скота, овец, свиней и диких животных ;

- изучить культурально-морфологические и биохимические свойства выделенных культур микобактерий;
- изучить патогенность *M.kansasii*, *M xenopi*, *M.intracellulare*, *M.marinum*, *M.scrofulaceum* , *M.fortuitum* для морских свинок;
- изучить патогенность *M.bovis*, *M.avium*, *M.scrofulaceum* и *M.fortuitum* для белых мышей;
- изучить патогенность *M.kansasii*, *M.scrofulaceum* для овец в сравнении с *M.bovis*, *M.tuberculosis*, *M.avium* .

1.4 Научная новизна. Подтверждена убиквитарность

нетуберкулезных микобактерий, выделенных из объектов внешней среды, из поверхности кожи, носовой слизи, спермы и биоматериала от крупного рогатого скота, овец, свиней, птицы и диких животных.

Показано , что у морских свинок, зараженных внутрибрюшинно культурами *M.kansasii*, *M.xenopi* , *M.fortuitum*, *M.marinum* и *M.intracellulare*, развивается латентная инфекция с поражением сальника в области желудка с последующими репаративными процессами к 60-му дню.

Обнаружено перманентное появление у белых мышей очагового (иногда диффузного) некроза хвоста при подкожном и внутрибрюшинном методах заражения их *M.scrofulaceum*;

Установлена зависимость проявления патологоанатомических изменений у белых мышей при заражении их культурой *M.bovis*. При подкожном заражении белых мышей *M.bovis* вызывают патологоанатомические изменения через 30 дней , а при внутрибрюшинном – через 10 дней и характеризуются более тяжелым течением инфекционного процесса : увеличением селезенки, образованием в печени и легких туберкулезных узелков.

Показано, что у овец *M.kansasii* персистируют в организме и сенсибилизируют их к туберкулину для млекопитающих и КАМ, не вызывая патологических изменений. *M.scrofulaceum* обуславливают у овец

патологоанатомические изменения, сходные с туберкулезными. *M.bovis* у овец вызывает характерные патологоанатомические изменения, а *M.tuberculosis*, *M.kansasii* и *M.avium* – только сенсibiliзируют организм животных к туберкулину.

1.5.Практическая значимость. Результаты исследований включены в «Наставление по диагностике туберкулеза животных», утвержденного Департаментом ветеринарии Минсельхоза России 18 ноября 2002г.

1.6Личный вклад соискателя заключается в бактериологическом исследовании биоматериала и объектов внешней среды, идентификации микобактерий, организации и проведении экспериментальных исследований на морских свинках, белых мышах и овцах, анализе и обобщении результатов исследований.

1.7Апробация работы. Материалы работы доложены на XII съезде фтизиатров РФ (Саратов,1994), на научно-практической конференции по проблеме туберкулеза и бруцеллеза сельскохозяйственных животных (Новосибирск, 1995); на Международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию Северного научно-исследовательского института животноводства и ветеринарии (г. Петропавловск, Северо-Казахстанская обл., Республика Казахстан, 2003), на Международной конференции «Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных» (Москва,2003), на Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Я.Р.Коваленко (г.Москва,2006),на заседаниях ученого совета ВИЭВ(2001,2002,2003,2004гг.). Основные положения, выводы и практические предложения, изложенные в диссертации, обсуждены и одобрены на межлабораторном совещании научных сотрудников ВИЭВ (2006г.).

1.8 Основные положения выносимые на защиту. Полученные экспериментальные данные позволяют вынести на защиту следующие основные положения:

- результаты исследований по изучению широты распространения микобактерий;
- результаты исследований по выявлению и идентификации нетуберкулезных микобактерий из биоматериала животных и объектов внешней среды;
- результаты сравнительного изучения культурально-морфологических, биохимических и патогенных свойств нетуберкулезных микобактерий.

1.9 Публикация результатов исследований. По материалам диссертационной работы опубликовано 7 научных статей.

1.10 Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 164 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, списка литературы. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 7... фотографиями. Список литературы включает 337 источника, в том числе 67 иностранных авторов.

1. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1. Материалы и методы исследований. Работа выполнена в лаборатории микобактериозов Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко и на опытной базе Вышневолоцкого отдела ВИЭВ (Тверская обл.) в соответствии с утвержденными планами научно-исследовательских работ в период 1989-2005 гг. (02.01М; 02.04.03Д и 02.01.01 РНПП фундаментальных и приоритетных прикладных исследований).

Для выделения культур микобактерий исследовали биоматериал от 252 голов крупного рогатого скота из различных регионов Российской Федерации, 95 овец, 5 свиней, реагировавших на туберкулин для млекопитающих, 5 кур, 73 оленей, 6 ланей, 2 муфлонов, 8 кабанов, 1 лося, 1 овцебыка, 3 фазанов, 1 грифовой цесарки, 1 райского журавля, 1 кольчатого чирка, 1 хохлатой нападидии и 1435 проб из объектов внешней среды (соскобы с кормушек, автопоилок, пробы почвы, фекалий, сена, соломы, комбикорма, торфа и других подстилочных материалов). Исследовали 98 проб носовой слизи и 70 проб смывов с кожи средней трети шеи крупного рогатого скота, 170 проб спермы быков-производителей. Пробы отбирали в соответствии с «Методическими рекомендациями по проведению лабораторных исследований при туберкулезе животных» (М., 1992).

При бактериоскопическом исследовании биоматериала от животных готовили мазки-отпечатки из внутренних органов и тканей, высушивали и красили по Циль-Нильсену. При культуральном исследовании биоматериал от животных и пробы из объектов внешней среды обрабатывали по методу А.П. Аликаевой (1967,1979). В качестве питательных сред для выделения культур микобактерий использовали среды Петраньяни, Финн-2, Левенштейна-Йенсена, Фаст-3Л. Посевы культивировали на протяжении 3 месяцев при температуре 37-38°C. При появлении роста колоний на питательных средах определяли их характер, готовили мазки и красили их по Циль-Нильсену.

Культурально-морфологические и биохимические свойства микобактерий изучали в соответствии с методическими рекомендациями «Бактериологическая и биохимическая идентификация микобактерий» (Т.Б.Ильина, 1975,1980), с приказом Минздрава СССР №558 от 08.06.78 года «Об унификации микробиологических методов исследований при туберкулезе» и с приказом Минздрава Российской Федерации №109 от 21 марта 2003года «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».

Для определения вида возбудителя туберкулеза выделенные культуры микобактерий вводили 3-м морским свинкам и 3-м кроликам по общепринятой методике. За животными вели наблюдение в течение 3-х месяцев. Если за этот период они не погибали, проводили эвтаназию морских свинок путем декапитации с помощью гильотины, кроликов – путем воздушной эмболии, согласно «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (1978), с последующим проведением патологоанатомических, бактериоскопических, культуральных и гистологических исследований материала от всех павших и убитых животных.

Патогенность нетуберкулезных (атипичных) микобактерий изучали на 455 морских свинках, 160 белых мышах и 35 овцах.

Морских свинок разделили по принципу аналогов по 20 голов в группе. Для заражения морских свинок использовали 2-х недельные культуры следующих штаммов: *M. scrofulaceum*, *M. marinum*, *M. intracellulare*, *M. bovis* (ЦВ-1), *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*. Эталонные тест-культуры для идентификации получены из музея микроорганизмов ВИЭВ.

Культуры *M. scrofulaceum* были выделены из лимфоузлов реагирувавшего на туберкулин крупного рогатого скота, принадлежащего совхозу «Красная пойма» Московской области. Культуры *M. fortuitum* выделены из лимфоузлов крупного рогатого скота, принадлежащего совхозу «Правдинский» Калининградской области. Культура *M. bovis* (ЦВ-1) выделена от коровы, реагирующей на туберкулин для млекопитающих, принадлежащей совхозу «Воздвиженский» Целиноградской области.

Проведены исследования на 105 морских свинках с использованием культуры 1с (выделенной от свиней, принадлежащих совхозу им. XXII партсъезда Тверской области), обозначенная как 1с и по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам отнесена к *M. intracellulare* и культуры, выделенной от крупного рогатого скота, принадлежащего совхозу

«Прогресс» Пензенской области, которая по совокупности признаков определена как *M.bovis*.

По 5 морских свинок убивали через 10, 20, 30 и 60 дней после заражения с последующим проведением патологоанатомических, бактериологических и гистологических исследований материала.

Для заражения белых мышей использовали 2-х недельные культуры *M.scrofulaceum*, *M.fortuitum*, *M.avium* и *M.bovis*. Мышей разделили по 20 голов в группе и, соответственно, заражали внутрибрюшинно и подкожно в дозе 1,0 мг взвеси культуры в 1,0 мл физиологического раствора.

По 5 мышей каждой группы убивали через 10, 20 и 30 дней после заражения с дальнейшим проведением патологоанатомических, бактериологических и гистологических исследований.

Экспериментальные исследования по изучению патогенности *M.kansasii* и *M.scrofulaceum* в сравнении с *M.bovis*, *M.tuberculosis* и *M.avium* провели на 35 овцах, которых разделили на 7 групп (6-опытных и 1- контрольную, по 5 голов в каждой).

Животным первой группы культуру *M.kansasii* вводили интратрахеально, затем орально – трехкратно с интервалом в 7 дней в дозе по 120 мг на животное. Овец второй группы заражали тем же способом культурой *M.scrofulaceum* в дозе по 120 мг на животное. Животных третьей группы так же заражали *M.bovis* в дозе по 12 мг на животное, четвертой – *M.bovis* в дозе по 120 мг на животное, пятой- *M.tuberculosis* в дозе по 120 мг на животное, шестой- *M.avium* в дозе по 120 мг на животное, животных седьмой группы не заражали (контроль).

Экспериментально зараженных овец опытных и контрольной групп содержали в течение 10 месяцев и через каждые 30 дней исследовали туберкулиновой или симультанной пробами с ППД-туберкулином для млекопитающих и комплексным аллергеном из атипичных микобактерий (КАМ). Реакцию учитывали через 48 часов после введения аллергена и оценивали по величине припухлости от + до ++++.

От животных брали пробы сыворотки крови для серологических и пробы крови, молока и фекалий для бактериологических исследований.

РСК с комплексным туберкулезным антигеном УНИИЭВ и туберкулезным антигеном СибНИВИ ставили согласно «Наставлению по диагностике туберкулеза животных», утвержденному Главным управлением ветеринарии Госагропрома СССР 25.02.86 г.

По окончании срока эксперимента животных убили и биоматериал исследовали бактериологически и гистологически. Бактериологическое исследование биоматериала проб крови, молока и фекалий проводили по общепринятым методикам.

Патоморфологические исследования проводили совместно с кандидатами ветеринарных наук О.В.Якушевой и В.С.Суворовым.

Полученные в процессе работы цифровые показатели обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. Рассчитывали средние арифметические показатели, достоверность которых определяли с помощью критерия Стьюдента (В.М.Шмидт, 1984).

Методики отдельных исследований изложены в соответствующих разделах диссертации.

2.2. Результаты исследований

2.2.1. Изучение частоты выделения нетуберкулезных микобактерий из объектов внешней среды, биоматериала от крупного рогатого скота, овец, свиней и диких животных.

Нами исследован биоматериал, полученный от 289 голов реагирующего на ППД-туберкулин для млекопитающих крупного рогатого скота 28 хозяйств 6 областей (Калужская, Брянская, Пензенская, Волгоградская, Калининградская, Московская) и Республики Чувашия. В этих хозяйствах проводились комплексные (аллергические, патоморфологические и

бактериологические) исследования по выяснению эпизоотического статуса поголовья крупного рогатого скота.

Одновременно в этих хозяйствах отбирали пробы из объектов внешней среды с целью выделения микобактерий. В результате исследований выделено 66 культур микобактерий, отнесенных к 8 видам (*M.gordonae*, *M. triviale*, *M.terrae*, *M.intracellulare*, *M.phlei*, *M.fortuitum*, *M.vaccae*, *M.flavescens*). В каждой из обследованных областей выделяли разные виды микобактерий (табл.1). Только *M.flavescens* выделены в хозяйствах Московской обл.. Полученные результаты свидетельствуют о географическом различии микобактериального фона.

Таблица 1 – Частота выделения культур микобактерий из объектов внешней среды различных областей РФ

№ п/п	Наименование области	Исследовано проб	Выделено культур микобактерий	Виды микобактерий
1.	Калининградская	214	15 (7,0%)	<i>M. gordonae</i> , <i>M. triviale</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. intracellulare</i>
2.	Пензенская	869	26 (2,9%)	<i>M. phlei</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. vaccae</i>
3	Московская	259	5 (1,9%)	<i>M. phlei</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. flavescens</i> , <i>M. vaccae</i>
4.	Республика Чувашия	12	2 (16,6%)	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. intracellulare</i>
5.	Тверская	27	1 (4,0%)	<i>M. intracellulare</i>
6.	Волгоградская	28	14 (50,0%)	<i>M.phlei</i> , <i>M.vaccae</i> , <i>M.fortuitum</i>
7.	Калужская	17	3 (17,6%)	<i>M. phlei</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. vaccae</i>
	Всего:	1426	66 (4,5%)	

Обобщенные результаты исследований объектов внешней среды, окружающих животных, на наличие микобактерий приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты исследований по выделению атипичных микобактерий из объектов внешней среды

№№ п/п	Объекты внешней среды	Исследовано проб	Выделено культур	%
1.	Подстилка	65	5	7,6
2.	Почва	69	7	10,1
3.	Соскобы со стен животноводческих помещений	155	8	5,1
4.	Соскобы с полов	253	16	6,3
5.	Соскобы с кормушек	261	14	5,3
6.	Соскобы с навозных желобов	52	15	28,8
7.	Смывы с поилок	34	11	32,3
8.	Корма	17	7	41,1
9.	Пробы с территории ферм	9	3	33,3
10.	Пробы навоза	33	12	36,3
	Всего:	948	98	10,3

Из таблицы 2 видно, что при бактериологических исследованиях выделено 98 культур микобактерий, что составляет 10,3% от числа исследованных проб. Наиболее часто нетуберкулезные микобактерии выделяли из проб кормов (41,1%), навоза (36,3%), с территории ферм (33,3%), поилок (32,3%), соскобов с навозных желобов (28,8%). В одном хозяйстве Волгоградской области из проб кормов и воды выделили 2 культуры *M.avium* и

микобактерии II и III групп по Раньону. Из проб почвы выделили одну культуру *M. bovis* и 2 культуры микобактерий II и III групп по Раньону.

Из биоматериала от реагировавшего на туберкулин крупного рогатого скота выделяли возбудителей туберкулеза и нетуберкулезные микобактерии. Наиболее часто выделяли нетуберкулезные микобактерии II и III групп по Раньону (табл.3).

Таблица 3 – Частота выделения микобактерий из биоматериала крупного рогатого скота (реагировавшего на ППД- туберкулин для млекопитающих)

№ п/п	Наименование областей	Исследовано материалов (голов)	Выделено культур микобактерий	Группы микобактерий по Раньону
1.	Калужская	36	5 (13,8%)	IV
2.	Брянская	4	1	III
3.	Пензенская	76	30 (39,4%)	III-IV
4.	Волгоградская	28	39	II, III и IV
5.	Орловская	3	3	IV
6.	Саратовская	5	4	IV
7.	Калининградская	26	8 (30,7%)	III-IV
8.	Московская	99	4 (4,0%)	IV
9.	Республика Чувашия	12	2 (16,6%)	III-IV
	Всего	289	96 (33,2%)	

В ряде случаев нетуберкулезные микобактерии изолировали параллельно с *M. bovis* из биоматериала от одних и тех же животных.

Культуры нетуберкулезных микобактерий чаще выделяли из брыжеечных лимфоузлов. В отдельных случаях выделяли из этих же лимфоузлов и культуры возбудителей туберкулеза. Так, из 39 культур микобактерий, выделенных в хозяйствах Волгоградской области, из брыжеечных лимфоузлов выделили 11 культур, в том числе *M. tuberculosis* - 1, *M. bovis* – 2 и нетуберкулезных микобактерий – 8 культур (II гр. по Раньону - 5, III -2, IV – 1). Из заглочных лимфоузлов выделили 9 культур (*M. bovis* –

1, II и IV групп по Раньону – 8). Из средостенных лимфоузлов выделили 6 культур (*M. bovis* – 1, II группы – 2, IV – 3).

В колхозе им. Суворова Калининградской области из биоматериала от 6 телят в возрасте до года выделили 9 культур нетуберкулезных микобактерий (*M. triviale* - 3, *M. intracellulare* – 1, *M. fortuitum*- 3, *M. terre*- 1, *M. gordone* -1).

Микобактерии выделяли из средостенных (*M. triviale*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*), предопаточных (*M. triviale*) и брыжеечных (*M. triviale*, *M. gordone*, *M. terre*, *M. fortuitum*) лимфоузлов. Из кишечника выделили *M. fortuitum*.

При исследовании 5 проб биоматериала от 5 свиней выделили 5 культур нетуберкулезных микобактерий III группы по Раньону (совхоз им. XXII партсъезда Тверской области). Среди них одна культура охарактеризована как *M. intracellulare*.

Бактериологическим исследованием биоматериала от 95 овец выделили 15 культур *M. bovis* (15,7%) и 19 – нетуберкулезных микобактерий (20%). От 5 кур выделили 4 культуры *M. avium* и одну культуру *M. intracellulare*.

Исследованием биоматериала от 90 диких животных, отстрелянных в заповедниках «Аскания-Нова» о.Бирючий и «Хоперский» Воронежской области, выделили 19 культур нетуберкулезных микобактерий IV группы по Раньону (21,1%).

При исследовании биоматериала от 8 животных зоопарка (овцебыка, фазанов, цесарки, журавля, чирка) выделили 7 культур микобактерий (1 культура *M. bovis* из биоматериала от овцебыка и 6 культур *M. avium* от фазанов, цесарки, журавля, чирка).

Исследованием 17 проб фекалий выделили 4 культуры нетуберкулезных микобактерий IV группы по Раньону (2 культуры от овцебыков и 2 – от цесарок). В одном случае выделили *M. avium* из фекалий вольера цесарок.

При бактериологическом исследовании 98 проб носовой слизи коров выделили 53 культуры (54,0%) нетуберкулезных микобактерий IV группы по Раньону. Из 70 проб смывов с кожи коров выделили 14 культур (20%)

нетуберкулезных микобактерий IV группы по Раньону. Исследованием 170 проб спермы выделили 34 культуры микобактерий : *M.diernoferi* -1(2,7%), *M.gastri* – 5(13,5%), *M.smegmatis* – 9(24,3%), *M.flavescens* – 1(2,7%), *M.fortuitum* – 1(2,7%), *M.chelonae* – 2(5,4%) и 15 культур быстрорастущих микобактерий.

Все культуры, выделенные от животных, охарактеризованы по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам и соответствовали референтным штаммам, что и позволило отнести их к соответствующим видам и группам микобактерий (табл.4).

Таблица 4 - Характеристика культуральных и биохимических свойств выделенных культур

Наименование Теста	<i>M.scrofulaceum</i>	<i>M.fortuitum</i>	Культура 1с (<i>M.intracellu- -lare</i>)	Культура 2кр (<i>M.bovis</i>)	Культура ЦВ-1 (<i>M.bovis</i>)
Скорость роста	13 дней	7 дней	20 дней	27 дней	30 дней
Рост T25°C	+	+	+	-	-
Рост T 37°C	+	+	+	+	+
Рост T45°C	-	-	+	-	-
Рост на МПБ	+	+	+	-	-
Пигментообразование	Ф	-	-	-	-
Гидролиз Твин-80	-	+	-	-	-
Редукция нитратов	-	+	+	-	-
Аккумуляция железа	-	+	-	-	-
Рост с сал.натр.	+	+	+	-	-
Активность каталазы	+	+	+	-	-
Термостаб. каталаза	+	+	+	-	-
Ферментация:					
Мочевины	+	+	-	+	+
Никотинамида	+	+	+	-	-
Пиразинамида	+	+	+	-	-
Арилсульфатазная активность	-	+	-	-	-

Обозначения : сал.натр. – салициловый натрий

Ф – фотохромогенные микобактерии

+ - отмечен рост на питательной среде

± - скудный рост на питательной среде

Результаты исследований подтверждают убиквитарность нетуберкулезных микобактерий.

2.2.2 Изучение патогенных свойств нетуберкулезных микобактерий для морских свинок и белых мышей

Перед заражением морских свинок исследовали на спонтанный туберкулез туберкулиновой пробой ППД-туберкулином для млекопитающих в дозе 25 ТЕ\ 0,1 мл.

Животных разделили по принципу аналогов в зависимости от метода заражения.

При изучении патогенных свойств выделенных микобактерий использовали алиментарный, интратестиккулярный, подкожный и внутрибрюшинный методы заражения. Заражение животных проводили 2-х недельной культурой в дозе 1,0 мг в 1,0 мл физиологического раствора при алиментарном, подкожном, внутрибрюшинном и в дозе 1,0 мг в 0,2 мл физиологического раствора при интратестиккулярном методе заражения.

Через 10, 20, 30 и 60 дней после заражения убивали по 5 морских свинок на каждый срок с последующими патоморфологическим и культуральным исследованиями.

В результате проведенных исследований (табл. 5,6) установлено, что наибольший процент роста культур отмечен при интратестиккулярном и внутрибрюшинном методах заражения морских свинок культурой 1с, а в случае с культурой 2кр, охарактеризованная как *M.bovis*, 100% рост наблюдался в течении 60 дней опыта (срок окончания опыта).

Таблица 5 - Высеваемость культур 2кр и 1с в зависимости от метода заражения и сроков убоя морских свинок

№ п/п	Культура для заражения	Метод заражения	Высеваемость культур через: (%)							
			10 дней		20 дней		30 дней		60 дней	
			орг.	сем.	орг.	сем.	орг.	сем.	орг.	сем.
1.	1с	Алиментарно	40		52		60		0	
2.	1с	Интрагестукулярно	100	100	100	100	100	100	84	100
3.	1с	Подкожно	32		100		100		24	
4.	1с	Внутрибрюшинно	100		100		100		88	
5.	2кр	Алиментарно	68		88		40		-	
6.	2кр	Интрагестукулярно	100	100	100	100	100	100	52	68
7.	2кр	Подкожно	100		100		100		-	
8.	2кр	Внутрибрюшинно	100		100		100		-	

Обозначения : орг. – выделение культуры из внутренних органов

сем. – выделение культуры из семенников

Таблица 6 - Высеваемость культур в зависимости от метода заражения и сроков убоя морских свинок

№ п/п	Культура для заражения	Метод заражения	Высеваемость культур через: (%)							
			10 дней		20 дней		30 дней		60 дней	
			орг.	сем.	орг.	сем.	орг.	сем.	орг.	сем.
1.	M.kansasii	Подкожно	12		-		100		100	
2.	M.kansasii	Интрагестукулярно	100	100	68	80	68	68	-	28
3.	M.kansasii	Внутрибрюшинно	80		16		4		4	
4.	M.fortuitm	Подкожно	-		-		-		-	
5.	M.fortuitm	Интрагестукулярно	-	-	-	-	-	-	-	-
6.	M.fortuitm	внутрибрюшинно	-		-		-		-	
7.	M.xenopi	Подкожно	-		100		28		4	
8.	M.xenopi	Интрагестукулярно	100	100	100	100	64	64	8	4
9.	M.xenopi	Внутрибрюшинно	100		100		-		5	
10.	M.marinum	Подкожно	20		-		-		-	
11.	M.marinum	Интрагестукулярно	50	76	-	20	-	-	-	-
12.	M.marinum	внутрибрюшинно	24		58		20		-	
13.	M.intracellulare	Подкожно	100		20		7		-	
14.	M.intracellulare	Внутрибрюшинно	100		50		50		20	
15.	M.intracellulare	Интрагестукулярно	100	100	20	50	60	66	20	-
16.	M.bovis(ЦВ-1)	Подкожно	4		80		20		100	
17.	M.bovis(ЦВ-1)	Интрагестукулярно	-	40	88	13	20	26	-	16
18.	M.bovis(ЦВ-1)	Внутрибрюшинно	60		100		100		100	

орг – выделение культуры из внутренних органов

сем – выделение культуры из семенников

Установлено, что у морских свинок при внутрибрюшинном заражении культурами *M. kansasii*, *M. xenopi* и *M. fortuitum* закономерно образуются поражения на сальнике в области желудка, которые редуцируются к 60-му дню, в то время как при заражении морских свинок культурой *M. bovis* патологический процесс прогрессирует.

Культуры *M. kansasii* и *M. xenopi* выделяются (100%) в первые 20 дней после заражения морских свинок, в то время как культура *M. fortuitum* не выделялась на протяжении всего периода опыта (60 дней), высеваемость культуры *M. bovis* прогрессирует. Так, если через 10 дней она составила 60%, то через 20, 30 и 60 дней – 100%.

Патогенность *M. bovis*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum* и *M. avium*, также изучали в опытах на белых мышях.

Животных (по 20 голов на каждый метод) заражали внутрибрюшинно и подкожно в дозе 1,0 мг взвеси культуры в 1,0 мл физиологического раствора. Белых мышей убивали на 10, 20, 30 и 60 -е сутки после заражения и проводили патологоанатомические, патоморфологические и культурально-морфологические исследования.

Таблица 7- Высеваемость культур в зависимости от метода заражения и сроков убоя белых мышей

№ п/п	Культура для заражения	Метод заражения	Высеваемость культур через: (%)			
			10 дн.	20 дн.	30 дн.	60 дн.
1.	<i>M. bovis</i> (ЦВ-1)	Подкожный	100	40	-	-
2.	<i>M. bovis</i> (ЦВ-1)	Внутрибрюшинный	100	100	100	100
3.	<i>M. scrofulaceum</i>	Подкожный	-	-	-	-
4.	<i>M. scrofulaceum</i>	Внутрибрюшинный	100	60	-	-
5.	<i>M. avium</i>	Подкожный	-	-	-	40
6.	<i>M. avium</i>	Внутрибрюшинный	-	-	20	100
7.	<i>M. fortuitum</i>	Подкожный	-	60	40	-
8.	<i>M. fortuitum</i>	Внутрибрюшинный	-	-	-	-

Обозначения : дн. – дни после заражения

При заражении белых мышей *M.bovis* подкожно и внутрибрюшинно выделение исходной культуры составило 100%, причем культура была выделена во все сроки исследования. Патологоанатомические изменения (увеличение печени, образование узелков) наблюдали в течение всего опыта. Наиболее характерные изменения при внутрибрюшинном методе заражения : увеличение селезенки, пневмония и образование узелков на сальнике в области желудка.

При подкожном заражении культурой *M.scrofulaceum* видимых изменений во внутренних органах не обнаружено, на 30-60 дни отмечено образование очагового некроза хвоста. При этом исходная культура не была выделена.

При внутрибрюшинном методе заражения отмечено образование точечных узелков во внутренних органах на 10 день после заражения, на 20-й – увеличение селезенки (примерно в 1,5 раза), на 30-й - очаговый некроз хвоста, на 60-й – во внутренних органах видимых изменений не наблюдали.

Выделение исходной культуры отмечали только на 10-й и 20-е дни после заражения.

При подкожном заражении белых мышей культурой *M. fortuitum* патологоанатомических изменений не установлено. Культуру выделяли на 20-е и 30-е дни после заражения. Высеваемость культуры составляла 60 и 40% соответственно.

При внутрибрюшинном методе заражения отмечено образование незначительных узелков в печени и увеличение селезенки. Исходная культура не выделялась.

При подкожном заражении *M. avium* изменений во внутренних органах не отмечено, исходная культура была выделена только на 60-й день после заражения , при этом высеваемость составила 40%.

Внутрибрюшинное заражение вызывало у белых мышей незначительное увеличение печени через 10 дней после заражения, увеличение селезенки, к

концу опыта на сальнике в области желудка – образование узелков. Высеваемость составляла 20% - через 30 дней и 100% к концу опыта.

При гистологическом исследовании материала от белых мышей, зараженных *M.avium*, установили слабо выраженную клеточную реакцию паренхиматозных органов, связанную с заражением. В интерстициальной ткани легких находили мелкие эпителиоидные скопления. В печени и селезенке у большинства животных выявляли мелкие, без распада, эпителиоидноклеточные гранулемы.

В результате проведенных исследований установлено, что при подкожном заражении белых мышей культурой *M. bovis* патологоанатомические изменения развиваются через 30 дней, а при внутрибрюшинном методе – через 10 дней и характеризуются более тяжелым течением патологического процесса: увеличением селезенки, образованием узелков в печени и легких.

Подкожное и внутрибрюшинное заражение культурой *M.scrofulaceum* закономерно вызывает у белых мышей очаговый, а иногда и диффузный некроз хвоста, что может являться дифференцирующим признаком при идентификации микобактерий.

Культура *M.avium* вызывала у белых мышей патологоанатомические изменения только при внутрибрюшинном методе заражения на 60-й день, которые характеризовались незначительным увеличением печени, селезенки и образованием узелков на сальнике в области желудка.

2.2.3. Сравнительная оценка патогенных свойств *M.scrofulaceum*, *M.kansasii*, *M.bovis*, *M.tuberculosis* и *M.avium* для овец

В опытах по оценке патогенных свойств различных микобактерий использовано 35 голов овец в возрасте 1 года, они были разбиты на группы по 5 голов в опытных и контрольной группах.

Для определения патогенности использовали 2-х недельные культуры *M.scrofulaceum*, *M.bovis*, *M.tuberculosis*, *M.avium*, *M.kansasii*.

Применяли интратрахеальный и алиментарный методы заражения: доза каждой культуры составляла 120 мг бакмассы разведенной в 10,0 мл физиологического раствора.

После заражения животных исследовали туберкулином для млекопитающих и КАМ через каждые 30-60 дней после заражения. От животных исследовали пробы сыворотки крови в РСК, бактериологически пробы крови, фекалий и молока. Всего культурально исследовали 162 пробы крови, 92 пробы фекалий и 9 проб молока от зараженных овец.

Результаты аллергических и серологических исследований показали, что овцы, зараженные *M.kansasii*, реагировали на ППД- туберкулин для млекопитающих и КАМ, но интенсивность реакций была разной. Через 30 дней после заражения на туберкулин реагировали 4 овцы с интенсивностью реакций в ++ и +++, на КАМ – 5 овец с интенсивностью реакций в +++ и +++++. Животные реагировали на туберкулин при исследованиях через 105 и 153 дня после заражения. В дальнейшем реакции начали выпадать, в то же время на КАМ они сохранялись.

При серологическом исследовании проб сыворотки крови в РСК с КТА УНИИЭВ и туберкулезным антигеном СибНИВИ, показания РСК были положительными в одном случае с туберкулезным антигеном СибНИВИ.

Овцы, зараженные *M.scrofulaceum*, также реагировали на туберкулин и КАМ, но реакция на КАМ были интенсивнее. Интенсивность реакций на туберкулин уменьшалась при повторных исследованиях.

Положительные показания РСК установили только в двух случаях при исследовании через 30 дней после заражения.

Животные, зараженные *M.bovis* (независимо от дозы заражения), как правило, реагировали на туберкулин. Аналогично реагировали на туберкулин и овцы, зараженные *M.tuberculosis*. У овец, зараженных *M.avium*, аллергические реакции появились позже (через 105 дней после заражения) и наблюдались не у всех исследованных животных.

При серологическом исследовании комплементсвязывающие антитела выявляли у всех животных, зараженных *M.bovis*. С сыворотками крови овец, зараженных *M.tuberculosis*, положительные показания РСК были в двух случаях из пяти. Такие же данные были и с сывороткой крови овец, зараженных *M.avium*.

Результаты бактериологических исследований по выделению культур после заражения из проб крови и фекалий от овец, зараженных *M.kansasii*, *M.tuberculosis* и *M.avium* показывают, что культура *M. kansasii* выделена в двух случаях при исследовании проб крови от двух овец (№ 8840 и № 8816) и в одном случае при исследовании проб фекалий. Из пробы крови, полученной от овцы № 8840, культуру выделили через 105 дней после заражения, а из пробы крови овцы № 8816 – через 153 дня. Из пробы фекалий от овцы № 8831 выделена культура через 185 дней после заражения. Это свидетельствует о циркуляции *M. kansasii* в организме и выделении его во внешнюю среду.

В группе овец, зараженных *M.tuberculosis*, исходная культура выделена также в двух случаях - из проб фекалий, и 2- из проб крови.

От овец, зараженных *M.avium*, культура выделена только в одном случае, через 185 дней после заражения из крови.

При послеубойном осмотре овец не выявлено патологических изменений. Также их не выявили и при гистологических исследованиях послеубойного материала.

Таким образом, возбудитель туберкулеза человеческого и птичьего видов, а также *M.kansasii* вызывают лишь сенсibilизацию организма животных к туберкулину.

При культуральном исследовании проб крови и фекалий от овец, зараженных *M.scrofulaceum* ни в одном случае не выделили исходную культуру.

От животных, зараженных *M.bovis*, выделили исходную культуру в 5-ти случаях, из проб крови - через 105, 185, 226 и 262 дня, и в 5-ти случаях – из проб фекалий – через 105, 153 и 226 дней после заражения. Из 9 проб молока культуру выделили в двух случаях через 153 и 226 дней после заражения.

При вскрытии убитых овец, зараженных *M.scrofulaceum*, обнаруживали множественные инкапсулированные и обызвествленные очаги некроза величиной от макового зерна до лесного ореха. Большинство этих очагов имело округлую форму, очаги находились на расстоянии друг от друга и не формировали конгломератов. Отмеченные поражения локализовались в верхушечных и верхних отделах диафрагмальных долей легких. Регионарные бронхиальные лимфатические узлы были увеличены. Гистологически в легких обнаружили множественные участки творожистого некроза. В центре таких участков наблюдали отложения извести. По периферии они были окружены отдельными гигантскими, изредка эпителиоидными клетками. Тенденции к распространению данные очаги не имели и были окружены соединительнотканной капсулой.

У овец, зараженных *M.bovis*, патологоанатомические изменения установлены в одном случае при заражающей дозе 12 мг и в 5 случаях у овец, зараженных 120 мг. Изменения локализовались в заглоточных, подчелюстных, бронхиальных, средостенных лимфатических узлах и легких. При бактериологическом исследовании культуру *M.bovis*, выделили в одном из пяти случаев от овец, зараженных в дозе 12 мг, и во всех случаях при заражении в дозе 120 мг.

Таким образом, проведенные исследования показали, что *M.scrofulaceum* могут вызывать у овец патологоанатомические изменения, похожие на туберкулезные. Это показывает, что при постановке диагноза на туберкулез у овец следует проводить дополнительные биологические исследования.

Выводы

1. Подтверждена убиквитарность нетуберкулезных микобактерий, которых выявляли из объектов внешней среды (от 5,1 до 41,1% исследованных проб), из биоматериала реагировавшего на туберкулин крупного рогатого скота (от 4 до 39,4% случаев), от овец – в 10%, от диких животных – в 21,1% случаев.

2. Установлено, что подкожное и внутрибрюшинное введение культуры *M.scrofulaceum* вызывает у белых мышей очаговый, а иногда и диффузный некроз хвоста, что может являться дифференцирующим признаком при идентификации микобактерий.

3. Установлено, что при внутрибрюшинном заражении морских свинок культурами *M.kansasii*, *M. xenopi* и *M. fortuitum* закономерно поражается сальник в области желудка. Культуры *M.kansasii* и *M. xenopi* выделяются (100%) в первые 20 дней после заражения морских свинок, а культура *M. fortuitum* не выделяется на протяжении всего периода опыта (60 дней).

4. Культура *M. bovis* при подкожном заражении белых мышей вызывает патологоанатомические изменения через 30 дней, а при внутрибрюшинном – через 10 дней после заражения, которые характеризуются увеличением селезенки, образованием узелков в печени и легких.

5. Культура *M. avium* вызывала у белых мышей патологоанатомические изменения только при внутрибрюшинном методе заражения на 60-й день.

6. Подкожное заражение *M. fortuitum* не вызывает у белых мышей патологоанатомических изменений, культуру выделяли через 20-30 дней после заражения. Внутрибрюшинное заражение вызывает образование узелков в печени.

7. Установлено, что культура *M. scrofulaceum* является патогенной для овец и обуславливает патологоанатомические изменения, сходные с туберкулезными. *M. bovis* у овец вызывает характерные для туберкулеза патологоанатомические изменения, а *M. kansasii*, *M. tuberculosis* и *M. avium* – только сенсibiliзируют организм животных к туберкулину.

Практические предложения

1. Предлагаем использовать при идентификации культуры *M.scrofulaceum* в качестве биологической модели белых мышей, а как дифференциальный признак – некроз хвоста при подкожном и внутрибрюшинном заражении последних.

2. При проведении биопробы, в случае гибели морской свинки без развития патологоанатомических изменений предлагаем проводить гистологические, патологоанатомические и культурально-морфологические исследования биоматериала от павшего животного и проведение биопробы с материалом от павшей свинки.

3. При проведении биопробы, в случае гибели морской свинки и обнаружении патологоанатомических изменений сомнительного характера, предлагается проведение патологоанатомических, гистологических и культурально-морфологических исследований биоматериала от павшего животного и проведение биопробы с материалом от павшей морской свинки.

4. При бактериологическом исследовании материала от овец необходимо проводить второй пассаж на лабораторных животных, используя биоматериал от первой морской свинки в случае отрицательной биопробы или сомнительных патологоанатомических данных.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Толстенко Н.Г. О патогенности *M.scrofulaceum* для морских свинок // В.И.Косенко, Н.Г.Толстенко, // Труды.ВИЭВ, 1991; Т.69, -С.123-126
2. Толстенко Н.Г. Экспериментальное изучение патогенности атипичных микобактерий. // Н.Г.Толстенко, Н.П.Овдиенко, В.И.Косенко, И.Е.Вельмискин, В.С.Суворов, С.Ю.Быкова // Тезисы докладов // XII съезд фтизиатров.- Саратов, 1994. С.234
3. Толстенко Н.Г. Микобактериальные инфекции овец и коз // Н.П.Овдиенко, А.Х.Найманов, Н.Г.Толстенко, А.А.Энгишев, И.Е.Вельмискин,

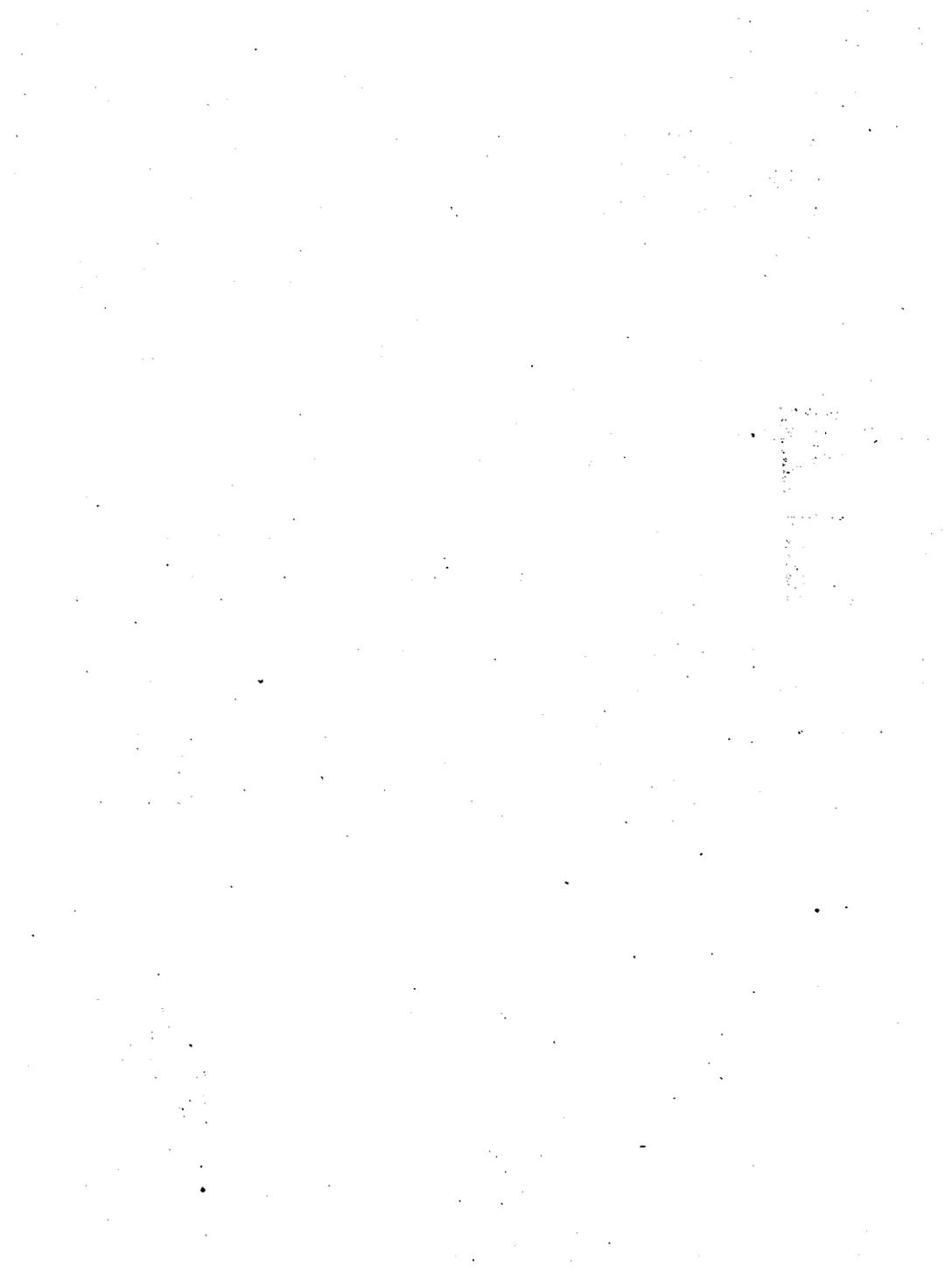
Б.Б.Насынов, В.С.Суворов, П.Н.Пыталев, Н.И.Григорьева \\Сборник трудов II (XII) съезда фтизиатров – Саратов, 1994. С.32.

4. Толстенко Н.Г. Экспериментальный туберкулез овец. \ Н.П.Овдиенко, А.Х.Найманов, В.И.Косенко, И.Е.Вельмискин, А.А.Энгишев, В.С.Суворов, Н.Г.Толстенко С.Н.Степнова \\Груды ВИЭВ. Т.73. 2003. С.31-36.

5. Толстенко Н.Г. О патогенности атипичных микобактерий для лабораторных животных. \ Н.П.Овдиенко, В.И.Косенко, Н.Г.Толстенко, В.С.Суворов, О.В.Якушева, Э.Л.Колоскова. \\Ветеринарная патология. №1-2. 2004. С.150-153.

6. Толстенко Н.Г. Патоморфологические изменения у лабораторных животных, зараженных нетуберкулезными микобактериями \ Э.Л.Колоскова, О.В.Якушева, В.С.Суворов, Н.Г.Толстенко, Е.Э.Соколова \\Материалы Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Я.Р.Коваленко. Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных. – М., 2006. С.252.

7. Толстенко Н.Г. О патогенности нетуберкулезных микобактерий для морских свинок и белых мышей \ Н.Г.Толстенко, Э.Л.Колоскова, В.С.Суворов, Е.А.Касьянова, Е.Э.Соколова \\Материалы Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Я.Р.Коваленко. Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных. – М., 2006. С.390-393.



Принято к исполнению 18/08/2006
Исполнено 21/08/2006

Заказ № 553
Тираж: 100 экз.

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Варшавское ш., 36
(495) 975-78-56
(495) 747-64-70
www.autoreferat.ru

