

ДАНКО ЮРИЙ ЮРЬЕВИЧ

**Туберкулез пятнистых уссурийских оленей
в условиях Северо-Запада России**

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Санкт-Петербур

2009



Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии.

Научный руководитель – доктор биологических наук
Сухинин Александр Александрович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Калишин Николай Михайлович

доктор ветеринарных наук, профессор
Сидорчук Александр Андреевич

Ведущая организация: ФГОУ ВПО «Вологодская государственная
молочнохозяйственная академия имени Н.В. Верещагина»

Защита состоится « 4 » июня 2009 г. в 11.00 часов на заседании
диссертационного совета Д 220.059.03 при ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская
государственная академия ветеринарной медицины» по адресу: 196084, г.
Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д.5, тел/факс (812) 388-36-31

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Санкт-
Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Автореферат разослан «04» мая 2009г. и размещен на сайте
<http://spbgavm.ru> «04» мая 2009г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Белова Л.М.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Несмотря на проводимые мероприятия эпизоотическая ситуация по туберкулезу крупного рогатого скота в большинстве субъектов РФ по-прежнему остается напряженной. Это связано с увеличением заболеваемости туберкулезом взрослого населения, имеющего контакты с животными; повышением лекарственной устойчивости микобактерий; их способностью передаваться через животных других видов, в том числе диких экзотических животных являющихся носителями возбудителя туберкулеза; с изменчивостью патогенных свойств возбудителя, приводящей к вспышкам туберкулеза среди животных считающихся устойчивыми к туберкулезу (барсуков, опоссумов, оленей) (Урбан В.П., Шишков В.П., 1986 г, Овдиенко Н.П. 2004 г., Демкин Г.П., 2004, 2005; Луницын В.Г., 2000, 2006; Молев А.И., 2007 Schlisser T., Bachmair K. 1957 и др.; Thoen и др., 1977; Collins Des. mond. M., 2003; Coley Peter, 2005; Trcka I., 2006; Delahay R.J., 2007). Поэтому актуальным является изучение биологических свойств возбудителя туберкулеза, выделенного от пятнистых уссурийских оленей, которые с целью сохранения как редкого и исчезающего вида были внесены в Красную Книгу (1974). Этому способствовала организация оленепарков в разных республиках СССР, в том числе и в Калининградской области. Мягкий климат, не слишком суровая зима, не очень широкие среднегодовые колебания температур положительно отразились на их разведении. Однако постоянные антропогенные воздействия на пятнистых оленей при domestикации повлекло за собой негативные явления. Содержание животных длительный промежуток времени в неволе, несменяемые пастбища, повышенная концентрация большого количества животных на ограниченных площадях, обрезание пант и другие факторы отрицательно влияют на иммунную систему, способствуют возникновению и распространению инфекционных и инвазионных болезней.

Поэтому не случайно в условиях Калининградской области несколько лет назад, впервые был зарегистрирован туберкулез пятнистых уссурийских оленей.

Изучением проблем туберкулеза пятнистых оленей и маралов занимались как отечественные ученые такие как С.Я. Любашенко, Е.П. Данилов, 1949 год; В.А. Новиков, 1950 год; О.В.Кроневальд, 2004 год; В.М. Шевпин, 2005 год; В.Г.Луницын, 1994, 2006 год; А.И.Молев, 2007 год; так и зарубежные исследователи С. David 1982; F. C. Griffing 1986; M.V.Palmer, W.R. Waters 2001, 2002, 2004.

Так как туберкулез пятнистых оленей в условиях Северо-Запада был подтвержден впервые, то возникла научно-производственная необходимость детального изучения данной патологии.

Учитывая вышеизложенное, целью работы являлось изучение туберкулеза пятнистых уссурийских оленей в условиях Северо-Запада РФ.

Задачи исследований:

1. Изучить особенности эпизоотологии туберкулеза пятнистых уссурийских оленей в условиях Северо-Запада РФ на примере Калининградской области.
2. Определить диагностическую ценность различных методов диагностики – эпизоотологического, клинического, патологоанатомического и бактериологического.
3. Установить характер течения инфекционного и эпизоотического процесса при туберкулезе пятнистых уссурийских оленей.
4. Разработать мероприятия по повышению эффективности диагностики и профилактики туберкулеза с учетом биологических особенностей оленей.

Научная новизна. Изучены особенности эпизоотологии и установлен характер течения инфекционного процесса при туберкулезе пятнистых уссурийских оленей в условиях Калининградской области. Определена диагностическая ценность эпизоотологического, клинического, патологоанатомического и бактериологического методов исследования. Изучены морфологические и культурально-биохимические свойства выделенных микобактерий; их патогенность. Определены факторы, способствующие активному развитию инфекционного процесса. Дана оценка влияния туберкулеза уссурийских пятнистых оленей на эпизоотическую ситуацию в Калининградской области.

Практическая значимость. Установленные особенности туберкулезной инфекции пятнистых уссурийских оленей в условиях Калининградской области позволили разработать схему диагностических исследований и комплекс мероприятий, направленных на повышение эффективности диагностики и профилактики туберкулеза.

Разработаны и утверждены на методическом заседании Научно-Координационного совета по животноводству и ветеринарии Северо-Западного научно-методического центра Россельхозакадемии (протокол № 2 от 10.09.2008г.) «Рекомендации по диагностике и профилактике туберкулеза пятнистых уссурийских оленей».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Особенности инфекционного процесса при туберкулезе пятнистых уссурийских оленей.

2. Сравнительная оценка методов диагностики – эпизоотологического, клинического, патологоанатомического и бактериологического.

3. Научное обоснование комплекс мероприятий по повышению эффективности диагностики и профилактики туберкулеза пятнистых уссурийских оленей с учетом их биологических особенностей.

Апробация работы. Основные положения и результаты исследований заслушаны и обсуждены на научных конференциях профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГАВМ (Санкт-Петербург, 2005, 2006, 2007, 2008), конференции молодых ученых и студентов, посвященной 200-летию высшего ветеринарного образования в России и 200-летию СПбГАВМ (2008), международном научно-практическом конгрессе: «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» (СПб, 2006), в конкурсе на лучшую научную работу аспирантов и молодых ученых в номинации «Зоотехния и ветеринария» в Северо-Западном федеральном округе (СПб, 2008).

Личный вклад автора. Личное участие автора осуществлялось на всех этапах работы. Автор провел мониторинг заболеваемости пятнистых уссурийских оленей в разных районах Калининградской области, выполнил комплексные научные исследования, произвел статистическую обработку результатов и проанализировал полученные данные.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 2 статьи из списка журналов рекомендуемых ВАК Минобрнауки России.

Структура и объем диссертации. Диссертация излагается на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, методов и результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и приложения. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 3 рисунками. Библиография включает 237 источников, в том числе 170 отечественных и 67 иностранных.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Работа выполнена в период с 2005 по 2008 год на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины».

Для изучения туберкулеза пятнистых уссурийских оленей был использован комплексный метод, включающий эпизоотологический, аллергический, клинический метод, патологоанатомический, и бактериологический методы диагностики.

Аллергическую диагностическую пробу ставили с целью выявления зараженных туберкулезом животных на разных стадиях инфекционного и эпизоотического процессов. С целью изучения характера аллергических реакций и определения наиболее благоприятного времени для их проведения, выявления максимального количества зараженных туберкулезом животных исследования проводили весной, летом, осенью и зимой. Для внутрикожной туберкулиновой пробы использовали сухой очищенный ППД для млекопитающих. Аллергические исследования проводили в соответствии с «Наставлением по диагностике туберкулеза» утвержденном Департаментом ветеринарии в 2002 году. Всего исследовано 572 рогача первично и 176 повторно. Специфичность внутрикожной туберкулиновой пробы подтверждалась результатами патологоанатомических и бактериологических исследований с использованием ПЦР-диагностики.

Патологоанатомические исследования проводили в условиях оленефермы на убойном пункте. Вскрытию подвергали выбракованных оленей по клиническим признакам, возрастным показателям, при снижении продуктивности, положительно реагировавших на внутрикожное введение туберкулина, а также павших рогачей за весь период исследования. Всего было подвергнуто диагностическому убою – 50 реагирующих на туберкулин, 68 рогачей по причине санитарного брака, 56 – павших рогачей.

Гистологические исследования проводили по общепринятой методике. Исследуемый материал фиксировали, промывали в проточной воде, подвергали целлоидиновой или парафиновой проводке, наклеивали на блоки и готовили препараты.

Бактериологическим исследованиям подвергли пробы патологического материала отобранного от рогачей положительно реагировавших на введение туберкулина, от

выбракованных по причине санитарного брака и подвергнутых диагностическому убою, от трупов рогачей.

Для выделения культур микобактерий туберкулеза использовали метод Гона, метод И.О.Аликаевой и метод НИИ Фтизиопульмонологии. Биопробу проводили на лабораторных животных, предварительно исследованных на наличие возбудителя туберкулеза. Всего заражено: 21 морская свинка и 21 кролик.

Учитывая особенности течения и проявления туберкулезной инфекции у животных данного вида и то, что эта болезнь была зарегистрирована впервые, мы провели дополнительные исследования методом ПЦР, что предусмотрено наставлением по диагностике туберкулеза.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом математической статистики, предложенным Ашмаринным И.П. (2000) и с помощью программ Microsoft Word и Excel 2007 и Statistika /W v.5.773, SPSS v.7.58.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Особенности эпизоотологии туберкулеза пятнистых уссурийских оленей в условиях Северо-Запада РФ

Мягкий климат, высокая среднегодовая температура, повышенная влажность воздуха в Калининградской области создают благоприятные условия для возникновения и распространения многих инфекционных болезней, в том числе особо опасных.

Причиной проведения нами детальных исследований, явился случай обнаружения патологических изменений у трупа рогача уссурийского пятнистого оленя в одном из хозяйств Калининградской области весной 2004 года. На вскрытии в лёгких были обнаружены очажки различной величины неизвестной этиологии. Предварительный диагноз на туберкулез был подтвержден бактериологическим методом. Была выделена культура возбудителя туберкулёза *Mycobacterium bovis* (экспертиза № 605 от 22.02.2004 года).

С этого момента начали изучение инфекции у пятнистых уссурийских оленей, причин ее появления и распространения у животных данного вида, изучение характера течения инфекционного и эпизоотического процесса.

Проведённым эпизоотологическим исследованием было установлено, что в

хозяйстве содержатся 1525 оленей, из них 572 рогача, 612 самок, 84 самки-олегухи, 210 голов молодняка, 47 самцов перворожек. Все животные, по возрастным и половым признакам, разбиты на группы и содержатся в отдельных загонах. Круглый год, и зимой и летом животные содержатся на пастбищах, огороженных металлической сеткой, высотой 2,5-3 м. Кормление и водопой происходит в естественных условиях. В период гопа увеличивается плотность животных на пастбищах. Два раза в год рогачей прогоняют через панторезный станок для обрезания пант с одновременным проведением диагностических исследований и ветеринарных обработок.

Установлено скопление большого количества животных на ограниченных площадях. На одно животное приходится 20-25 соток при норме 2 гектара (в 10 раз меньше), что создает возможность перезаражения животных как алиментарным, так и аэрогенным путем. Туберкулез среди оленей появился не вдруг и внезапно, а как следствие снижения резистентности макроорганизма с одной стороны, усиления патогенных свойств возбудителя с другой стороны, и на фоне благоприятных для возбудителя условий окружающей среды.

3.2. Клинический метод диагностики.

Клинический метод использовали при первичной постановке диагноза с целью обследования стада рогачей для выявления и удаления больных туберкулезом животных. Особенностью клинического обследования животных данного вида является то, что олень не подпускает человека на расстояние ближе, чем 50-100 метров и разглядеть и определить на таком расстоянии упитанность довольно трудно. Фиксация, загон в расколы, боксы или панторезный станок для проведения клинического обследования является сильным стрессом. Поэтому чаще всего клиническое обследование проводят в момент обрезания пант не более 2 раз в год.

Обследовать методом пальпации состояние подчелюстных, предлопаточных лимфоузлов, лимфоузлов надколенной складки сложно.

Поэтому мы считаем, что клинический метод в диагностике туберкулеза пантовых оленей имеет ограниченное применение, его информативность невысокая, проведение исследований в условиях производства сложно, так как животные данного вида довольно агрессивны.

3.3. Аллергический метод диагностики

Несмотря на внедрение в практику новых, совершенных методов аллергическая диагностическая проба на сегодняшний день остается основным прижизненным методом диагностики, позволяющая в большинстве случаев выявить зараженных туберкулезом животных как на ранних стадиях, так и в случае хронического течения болезни. Однако надо отметить, что в природе существует более 80 видов микобактерий (условно-патогенных и сапрофитов), которые могут вызывать парааллергические реакции на туберкулин.

Наставление, утвержденное в 2002 году по диагностике рекомендует использовать внутрикожную, подкожную, внутривенную и офтальмопробы, из которых основной является внутрикожная как наиболее простая и по методу введения игольным, и безигольным методами, и по учету. Данное наставление по диагностике разрабатывалось и утверждалось в основном для диагностики туберкулеза сельскохозяйственных животных, поэтому в нем нет рекомендаций в отношении диких или экзотических животных.

Данный метод не может быть автоматически перенесен на животных другого вида, в том числе на уссурийских пятнистых оленей, прежде всего потому, что животное дикое, фиксировать его так как крупный рогатый скот сложно, заранее подготовить место введения туберкулина за 24 часа и проводить исследования без прогона через панторезный станок невозможно. Любые исследования, в том числе и туберкулинизация является сильнейшим стрессом для животных. Поэтому аллергические исследования, взятие крови, дегельминтизации и вакцинации чаще всего должны проводиться не по графику, как у крупного рогатого скота, а лучше всего в летний период июль-август, когда условия кормления и содержания благоприятны для пятнистых уссурийских оленей, а показатели иммунной системы не имеют отклонений от нормы.

Результаты аллергических исследований свидетельствует о том, что максимальное количество зараженных туберкулезом рогачей было выявлено в 2005 году - 23 головы и в 2006 – 17 голов. На диагностическом убое обнаружили патологоанатомические изменения свойственные туберкулезу у 15 и 10 животных соответственно.

Большинство зараженных туберкулезом животных не реагируют на туберкулин зимой. Аллергические реакции выражены плохо (плотные, ограниченные). Это объясняется тем, что кожа в зимний период у животных толще, так как животные

зимуют в открытых загонах на снегу, шерсть плотная. При проведении аллергических исследований в июне мы убедились, что у большинства животных кожа тонкая, эластичная, реакции типичные, с характерными признаками. У отдельных животных наблюдали некроз эпидермиса. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты аллергических исследований на туберкулез (количество животных, в том числе повторно)

Год	Подвергнуто аллергическим исследованиям	Выявлено реагирующих на туберкулин	Подвергнуто диагностическому убою	Обнаружено измененный характерных для туберкулеза
2005	148	23	23	15
2006	300	17	17	10
2007	150	5	5	5
2008	150	5	5	4
всего	748	50	50	34

За время исследования из 572 обследованных рогачей было выявлено 50, положительно реагирующих на туберкулин, что составило 8,8%. Изменения свойственные туберкулезу обнаружили у 34 оленей (5,9%).

Результаты аллергических исследований на туберкулез свидетельствуют, прежде всего, об активном течении инфекционного и эпизоотического процессов с одной стороны и высокой специфичности аллергической диагностической пробы и ее диагностической ценности с другой.

3.4. Результаты патологоанатомического метода диагностики

С целью изучения характера, степени пораженности и локализации патологоанатомических изменений были проведены исследования убитых рогачей реагирующих на туберкулин. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Установлено, что из 50-ти положительно реагирующих на туберкулин рогачей, у 34 на вскрытии обнаружили изменения характерные для туберкулеза (68,0%). В 52,9% случаев наблюдали поражения легких и средостенных лимфоузлов, что свидетельствует об аэрогенном пути заражения.

У 8-ми животных обнаружили патологоанатомические изменения в заглочных лимфоузлах и у 4-х в брыжечных, что может свидетельствовать о заражении алиментарным путем с кормом или водой. Этот факт имеет принципиальное значение, прежде всего потому, что возбудитель может длительно сохраняться на пастбищах с момента организации оленефермы не подвергавшихся санации, что способствует постоянному перезаражению животных через корм.

Таблица 2. Результаты патологоанатомического исследования на туберкулез реагирующих на туберкулин животных за период с 2005-2008 гг.

Год	Обследовано животных	Обнаружено патологоанатомических изменений	Заглочные л/у	Легкие и средостенные л/у	Мезентериальные л/у	Генерализованная форма туберкулеза
2005	23	15	4	8	2	1
2006	17	10	2	6	1	1
2007	5	5	1	2	1	1
2008	5	4	1	2	0	1
итого	50	34 (68,0%)	8 (23%)	18 (52,9%)	4 (11,8%)	4 (11,8%)

О циркуляции в стаде высоковирулентного возбудителя свидетельствует генерализованная форма туберкулеза, выявленная у 4-х рогачей.

Кроме пораженных внутренних органов изменения обнаруживали в регионарных лимфоузлах: предпачочных, надколенной складки, паховых, что свидетельствует о высокой вирулентности возбудителя.

Это еще раз подтверждает наши наблюдения, что перекрестные пути перезаражения различных видов животных и человека позволяют возбудителю сохраняться в природе, поддерживать непрерывность эпизоотического и эпидемиологического процессов, постоянно менять свои свойства и реализовывать их на лобом виде животных. Эти данные согласуются с данными фтизиатров, которые в последнее время пришли к выводу, что возбудитель туберкулеза способен менять свои культурально-биохимические и патогенные свойства. И чем больше

применяется антибиотиков, тем агрессивнее становится возбудитель; чем жестче дезинфектанты - тем более устойчив возбудитель. Таким образом, человек непроизвольно сам этого не желая, способствует изменению свойств возбудителя туберкулеза. Поэтому в последнее время все чаще выделяют и от животных и от людей высоковирулентные штаммы способные вызвать активный инфекционный, эпизоотический и эпидемический процесс.

Обнаруженные у пятнистых уссурийских оленей патологоанатомические изменения свойственные туберкулезу свидетельствуют о том, что, несмотря на устойчивость макроорганизма возбудитель туберкулеза бычьего вида смог преодолеть защитный иммунный барьер и вызвать активный инфекционный процесс.

3.5. Результаты гистологических исследований на туберкулез

Результаты гистологических исследований подтвердили специфичность аллергической диагностической пробы и высокую ценность метода в постановке диагноза на туберкулез. Туберкулез у большинства животных находился на разных стадиях инфекционного процесса, о чем свидетельствовали обнаруженные как инкапсулированные очаги, так и вновь сформированные туберкулезные узелки, представленные скоплением лимфоидных клеток. Экссудативный процесс преобладал над продуктивным. Очаги в виде гнойных фокусов, как правило, заключены в соединительно-тканые капсулы.

Характер клеточных реакций и форма туберкулезного узелка у пятнистого уссурийского оленя отличается от такового у крупного рогатого скота. Эта особенность объясняется прежде всего повышенной резистентностью данного вида животных, о чем свидетельствует обнаружение незначительного количества эпителиодных и гигантских клеток.

В основном наблюдали экссудативные, тканевые реакции сопровождающиеся образванием жидкого выпота и миграцией лейкоцитов.

3.6. Результаты бактериологических исследований на туберкулез

Поскольку в наставлении по диагностике туберкулеза, утвержденном Департаментом ветеринарии МСХ РФ в 2002 года, излагается метод проведения бактериологических исследований у сельскохозяйственных животных и не освещаются вопросы бактериологических исследований диких экзотических животных, нет рекомендация по отбору проб, не уточняется схема проведения

освещаются вопросы бактериологических исследований диких экзотических животных, нет рекомендация по отбору проб, не уточняется схема проведения поэтому мы изучили особенности данного метода диагностики и определили его значения в постановке диагноза у данного вида животных.

При отборе проб патматериала учитывали устойчивость данного вида животных к туберкулезу, и особенности локализации инфекционного процесса, что имеет принципиальное значение. Лимфоузлы у данного вида животных очень мелкие и в большинстве случаев находятся в жировой ткани, обнаружить их довольно трудно необходимо точно знать топографию заглочных лимфоузлов, так как они находятся почти у основания черепа, где их обнаружить довольно трудно.

3.6.1. Морфологические свойства возбудителя

Результаты микроскопии (положительные или отрицательные) не дают основания для постановки диагноза на туберкулез, и являются предварительными.

Для микроскопии готовили 2-3 мазка из каждого лимфоузла и культур, высушивали на воздухе, фиксировали над пламенем, окрашивали по Циль-Нильсену и просматривали под микроскопом.

Микобактерии были красного цвета, имели форму палочек с хорошо выраженной зернистостью. При пересевах наблюдали значительный полиморфизм – от палочковидных до овоидных и кокко-форм.

3.6.2. Культурально-биохимические свойства возбудителя

С целью получения чистых культур микобактерий использовалась плотная дифференциально-диагностическая среда Левинштейна-Йенсена. Проводили обильный посев, слегка втирая материал в поверхность среды. Пробирки в наклонном положении под углом 45 градусов помещали в термостат при температуре +37-38°C на 2 дня. После этого пробирки герметизировали путем парафинирования или с помощью стерильных резиновых пробок и оставляли в термостате.

Пробирки с посевом просматривали не реже одного раза в неделю. Через 20-30 дней после посева отмечали слабый рост бактерий туберкулеза. *M. bovis* росли скудно, медленно в виде мягких, шероховатых, серо-белых колоний.

После выделения культур микобактерий проводили их идентификацию по методу разработанному в ЛНИИТ Г.Б. Ильиной, который позволяет определить видовую принадлежность и изучить культурально-биохимические свойства выделенных

культур микобактерий.

Характер окраски колоний определяли на среде Левинштейна-Йенсена, на которой все выделенные штаммы микобактерий возбудителя туберкулеза были кремового цвета, R-форм. **По скорости роста** на среде Левинштейна-Йенсена, выделенные штаммы были отнесены к медленно-растущим, так как рост обнаружили через 10-15 дней. **Салицилатный эффект** определяли по методике Tsucamura, с этой целью культуру выращивали на среде Левинштейна-Йенсена с добавлением 0.5-1,0 мг/мл салицилового натрия. Все выделенные культуры микобактерий на среде с салициловым натрием не росли, за исключением 2 культур атипичных микобактерий. **Рост микобактерий** определяли на среде Левинштейна-Йенсена при разных температурах (22-28°C, 37°C, 45°C, 52°C). *M. bovis* росли при температуре – +37°C, атипичные микобактерии: *M. intercellulare* при температуре – +45°C, а *M. phlei* при – +22°C. **Редукцию нитратов** определяли по методу, предложенному Tsucamura. Культура *M. bovis* дала отрицательный результат; *M. phlei* - положительный результат. **Амидазную активность** определяли по Tasquet. Все выделенные культуры микобактерий туберкулеза имели положительную мочевины, отдельные культуры имели слабо выраженные амидазные реакции с никотинамидом и пиразинамидом. Атипичные микобактерии *M. intercellulare* имели положительные реакции с никотинамидом и пиразинамидом; *M. phlei* имели положительные реакции с мочевиной, никотинамидом и пиразинамидом.

Установлено, что из патматериала, отобранного у 31 рогака, реагирующего на туберкулин, было выделено 14 культур возбудителя туберкулеза бычьего вида и 1 культура *M. intercellulare*.

Исследование 5-ти проб патматериала от животных выбракованных по причине санитарного брака и выделение от них в 2-х случаях *M. bovis* и в 1 случае атипичных микобактерий - *M. phlei* свидетельствует о том, что из организма зараженных животных выделяется возбудитель туберкулеза бычьего вида и атипичные микобактерии.

Исследование 4-х проб из патматериала от павших животных и выделение 3-х культур *M. bovis* свидетельствует о том, что выявить 100% зараженных туберкулезом животных невозможно.

Результаты бактериологических исследований 40 проб патологического материала

от животных: реагирующих, вынужденно убитых, павших и выделение от них возбудителя туберкулеза бычьего вида свидетельствует об активном течении инфекционного и эпизоотического процессов.

Выделение атипичных микобактерий от рогачей свидетельствует о том, что среди животных зараженных туберкулезом могут циркулировать атипичные микобактерии а их роль и значение требуют детального изучения и расшифровки.

Анализ результатов бактериологических исследований на туберкулез отобранных от рогачей свидетельствует о том, что данный метод имеет высокую диагностическую ценность и позволяет поставить заключительный диагноз и разработать систему ликвидационных и профилактических мероприятий.

Чувствительность бактериологического метода зависит от качества отбора проб, пересылки, метода посева, состава среды. Бактериологический метод позволяет выделить чистую культуру и определить его видовую принадлежность, а отсюда своевременно и правильно принять меры по купированию эпизоотического процесса.

Биологическую пробу применяли на лабораторных животных как с целью выделения культур микобактерий туберкулеза в исследуемом биоматериале, так и для определения видовой принадлежности.

За животными наблюдали в течении трех месяцев. В течении установленного срока лабораторные животные пали. У всех животных наблюдали генерализованную форму туберкулеза. У морских свинок в регионарных к месту введения паховых лимфоузлах на разрезе обнаруживали казеозные очаги. Аналогично были поражены и другие лимфоузлы. Селезенка и печень увеличены, плотные с серо-белыми и серо-желтыми мелкими слившимися узелками, в легких множество серо-белых очажков.

У кроликов наблюдали на вскрытии увеличение легких в них множество очажков часто с наличием некрозов. В печени, селезенке поражения наблюдались чаще в виде отдельных небольших узелков. У отдельных животных наблюдали поражение глазного яблока.

3.6.3. Полимеразная цепная реакция

Медленный рост большинства микобактерий на питательных средах, сложность изоляции возбудителя непосредственно из биоматериала, несовершенство даже самых тонких биохимических исследований не дает возможность идентифицировать близкородственные возбудители. Биохимическая идентификация длительна,

трудоемка, требует наличия определенного количества микобактерий, а для многих видов специфические тесты вообще не разработаны.

В связи с этим в последнее время применяется молекулярно-генетический метод (ПЦР). Исследовательскую работу выполняли в Калининградской областной ветлаборатории с использованием метода ПЦР утвержденного Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода РФ 27.01.1997 № 13-7-2/1840. Для постановки использовали тест систему обнаружения и дифференциации *M. bovis* и *M. tuberculosis*.

Возбудитель туберкулеза выделенный путем постановки биопробы, имел общие антигены свойственные штаммам БЦЖ был высоковирулентным.

Вторая выделенная нами культура была идентифицирована как комплекс микобактерий туберкулеза (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, БЦЖ).

Вместе с тем следует отметить, что, несмотря на высокую специфичность метода 5 проб дали отрицательный результат, не смотря на то, что в последствии от животных был выделен возбудитель туберкулеза *M. bovis*.

По-видимому в процессе перекрестных путей перезаражения возбудитель туберкулеза меняет свои свойства.

ПЦР надо использовать как дополнительный метод в диагностике туберкулеза.

4. ВЫВОДЫ

1. Комплексным методом диагностики (эпизоотологическим, клиническим, патологоанатомическим, бактериологическим) с последующим выделением и идентификацией возбудителя в Калининградской области зарегистрирован туберкулез пятнистых уссурийских оленей.
2. Изучены эпизоотологические особенности проявления туберкулеза. В 52,9% случаев установлен аэрогенный путь заражения, в 23,0% - алиментарный. Основными причинами, способствующими распространению туберкулезной инфекции в стаде рогачей явились: длительное использование несменяемых пастбищ; несоответствие нормы площади пастбищ на 1 животное; длительная эксплуатация рогачей как основного производителя пант; снижение защитных сил организма из-за действия различных стресс-факторов, в том числе антропогенных.
3. Определена диагностическая ценность различных методов диагностики:

- основным прижизненным методом является аллергический. За 4 года из 572 обследованных рогачей выявлено 50 реагирующих, что составило 8,8% от количества исследованных;

- у 34 животных (5,9%) туберкулез подтвержден патологоанатомически; генерализованная форма туберкулеза, обнаруженная у 4-х рогачей, свидетельствует о циркуляции в стаде высоковирулентного возбудителя болезни;

- бактериологический метод имеет высокую диагностическую ценность, позволяет выделить возбудитель и определить его видовую принадлежность. Чувствительность метода зависит от качества отбора проб, пересылки, подготовки и проведения исследований.

4. Генетическая идентификация культур методом ПЦР показала, что возбудители туберкулеза не однородны и имеют общие антигенные свойства с вакцинным штаммом БЦЖ (никогда не имевших с ним контактов) и относятся к комплексу туберкулезных микобактерий (*M.tuberculosis*, *M.bovis*). В месте с тем следует отметить, что, несмотря на высокую специфичность метода 5 проб дали отрицательный результат, в то время как в последствии от этих животных были выделены патогенные микобактерии;

5. Туберкулез у большинства животных находился на разных стадиях инфекционного процесса, о чем свидетельствуют обнаруженные туберкулезные узелки, представленные скоплением эпителиальных и гигантских клеток, на разных стадиях формирования.

6. Разработанные нами мероприятия по повышению эффективности диагностики и профилактики туберкулеза позволили купировать эпизоотический процесс.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Разработаны методические «Рекомендации по диагностике и профилактике туберкулеза пятнистых уссурийских оленей» (Одобрены и утверждены Северо-Западным научно-методическим центром Россельхозакадемии, протокол № 2 от 10.09.2008г.).

2. Результаты исследований по туберкулезу пятнистых уссурийских оленей используются в системе профилактических мероприятий в условиях оленеферм, а также в учебном процессе по обучению студентов ФГОУ ВПО «СПбГЛВМ».

2. Результаты исследований по туберкулезу пятнистых уссурийских оленей используются в системе профилактических мероприятий в условиях оленеферм, а также в учебном процессе по обучению студентов ФГОУ ВПО «СПбГАВМ».

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Данко Ю.Ю. Эпизоотические особенности туберкулезной инфекции / Ю. Ю. Данко, Ю. Ю. Данко // Материалы науч. междунар. конф. профессорско-преподавательского состава, науч. сотрудников и аспирантов СПбГАВМ. - СПб, 2005. - С.31-33.
2. Туберкулез уссурийского пятнистого оленя в условиях Северо-Запада России / Ю. Ю. Данко // Ветеринарный консультант. - 2006. - N7.-С.16-18.
3. Туберкулез уссурийского пятнистого оленя в условиях Северо-Запада России / Ю. Ю. Данко // Ветеринарная патология. - 2006. - N3.-С.96-100.
4. Данко Ю.Ю. Особенности эпизоотологии туберкулеза пятнистых оленей в условиях Калининградской области / Ю. Ю. Данко, В. А. Кузьмин, Ю.Ю. Данко // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: сб. науч. тр. / СПбГАВМ. - СПб, 2006. - N138.-С.34-36.
5. Данко Ю.Ю. Туберкулез пятнистого уссурийского оленя / Данко Ю.Ю. // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: сб. науч. тр. / СПбГАВМ. - СПб, 2007. - N139.-С.32-34.
6. Данко Ю.Ю. Анализ комплексного исследования на туберкулез пятнистых уссурийских оленей в Калининградской области / Ю. Ю. Данко, И. К. Русанов, И. А. Кузнецова// Ветеринария. Зоотехния. Комбикорма: каталог. Актуальные проблемы ветеринарной медицины: тез. докл. междунар. науч.-практ. конгресса. - СПб, 2006. - С.84-87.
7. Данко Ю.Ю. Методика аллергической диагностики туберкулеза пятнистого уссурийского оленя / Данко Ю.Ю., Сухинин А.А. // Материалы 62-й юбилейной науч. конф. молодых ученых и студентов, посвящ. 200-летию высш. вет. образования в России и 200-летию СПбГАВМ / СПбГАВМ. - СПб, 2008. - С.40-42.

2

Тиражирование и брошюровка выполнены в учреждении

«Университетские телекоммуникации»

197101, Санкт-Петербург, Саблинская ул., д.14, тел. (812) 233 4669

Тираж 100 экз.

Объем 1 у.п.л.