

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ**  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ДАГЕСТАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. М. ДЖАМБУЛАТОВА

На правах рукописи

**БАРАТОВ МАГОМЕД ОМАРОВИЧ**

**ОСОБЕННОСТИ ТУБЕРКУЛЁЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В  
РЕСПУБЛИКЕ ДАГЕСТАН (ЭПИЗОТОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА,  
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА И МЕРЫ БОРЬБЫ)**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА ВЕТЕРИНАРНЫХ НАУК**

Научный консультант:  
Заслуженный деятель науки РД  
доктор ветеринарных наук,  
профессор М.М. Ахмедов

Махачкала – 2017

## Оглавление

<b>Введение.....</b>	<b>4</b>
<b>Основная часть.....</b>	<b>13</b>
<b>1. Обзор литературы.....</b>	<b>13</b>
1.1. Краткая историческая справка.....	13
1.2. Особенности эпизоотического проявления туберкулезе КРС.....	15
1.3. Диагностика и неспецифическая сенсибилизация при туберкулезе.....	19
1.4. Профилактика и меры борьбы с туберкулезом.....	30
<b>2. Собственные исследования.....</b>	<b>35</b>
2.1. Материалы и методы.....	35
2.2. Особенности проявления туберкулеза КРС в Республике Дагестан.....	43
2.2.1. <i>Влияние зональных особенностей на эпизоотический процесс.....</i>	<i>64</i>
2.2.2. <i>Сезонная динамика туберкулеза крупного рогатого скота.....</i>	<i>70</i>
2.3. Совершенствование метода диагностики.....	74
2.3.1. <i>Общая характеристика коринебактерий.....</i>	<i>74</i>
2.3.2. <i>Биосфера и эволюционная приспособленность их к макроорганизму.....</i>	<i>88</i>
2.3.3. <i>Методы выделения коринебактерий.....</i>	<i>99</i>
2.4. Сенсибилизирующие свойства к туберкулину.....	106
2.4.1. <i>Разработка аллергена, изучение его специфичности и чувствительности в лабораторных и производственных условиях.....</i>	<i>106</i>
2.4.2. <i>Динамика аллергических реакций на туберкулин у зараженных коринебактериями животных.....</i>	<i>113</i>
2.5. Аллергическая диагностика коринебактериоза и ассоциативных с ним инфекций.....	121
2.6. Разработка методов культивирования коринебактерий.....	125
2.6.1. <i>Сравнительное изучение питательных сред.....</i>	<i>125</i>
2.6.2. <i>Совершенствование питательной среды для изолирования коринебактерий.....</i>	<i>128</i>
2.7. Распространение и видовой состав нокардий и родококков.....	135
2.7.1. <i>Разработка аллергенов из нокардий и родококков.....</i>	<i>144</i>
2.7.2. <i>Сенсибилизирующие свойства к туберкулину.....</i>	<i>148</i>
2.8. Совершенствование метода дифференциаций аллергических реакций на туберкулин.....	153
2.8.1. <i>Дифференциация микобактериоподобных микроорганизмов и их идентификация.....</i>	<i>153</i>

2.8.2.	<i>Разработка комплексного аллергена из микобактериоподобных микроорганизмов, испытание в лабораторных и производственных условиях.....</i>	169
2.9.	Разработка универсальной среды для микобактериоподобных микроорганизмов.....	175
2.10.	Сравнительная характеристика аллергенов в диагностике туберкулеза КРС.....	179
2.11.	Совершенствование мер борьбы с туберкулезом КРС с учетом зональных особенностей.....	186
	<b>Заключение.....</b>	190
	<b>Выводы.....</b>	198
	<b>Практические предложения.....</b>	200
	<b>Перспективы дальнейшей разработки.....</b>	201
	<b>Список использованной литературы.....</b>	202
	<b>Приложения.....</b>	240

## Введение

**Актуальность темы.** Туберкулез продолжает оставаться острой проблемой в ветеринарии и медицине, причиняя огромный ущерб народному хозяйству и представляя серьезную опасность населению. Основой борьбы с туберкулезом является диагностика внутрикожной пробой с применением ППД - туберкулина для млекопитающих. Однако, массовое выявление неспецифических реакций на туберкулин у животных, сенсibilизированных атипичными и сапрофитными микроорганизмами, делают результаты этой пробы ориентировочными.

Актуальность этой проблемы увеличивается из года в год. Так, в благополучных по туберкулезу хозяйствах выявляется в 5,3 раза больше реагирующих на туберкулин животных, чем в неблагополучных (Авилов В.М. 1992; Вышелесский С.Н. 1968, 1977; Найманов А.Х. 2002; Нуратинов Р.А. 1990; Овдиенко Н.П. 1987).

Резкое сокращение животных в общественном секторе и увеличение в частном (более 97% в республике) с характерными бесконтрольными перемещениями животных, кормов и продуктов, усугубило и без того тяжёлую эпизоотическую и эпидемиологическую ситуацию. Именно поэтому туберкулёз в последние годы получил различную степень распространения в отдельно взятых регионах, республиках и областях. Территория республики Дагестан является весьма неблагополучной по туберкулёзу в эпизоотическом и эпидемиологическом отношении. (Авилов В.М. 1997; Аллахвердиев И.И.1997; Гусейнов Г.К. 1996; Нуратинов Р.А. 1998, 2009; Овдиенко Н.П. 1989,1990; Третьяков А.Д. 1981; Урбан В.П. 1986, 1996; Хайкин Б.Я. 1989).

**Степень разработанности темы.** В настоящее время достаточно изучены источники возбудителя инфекции и пути распространения. В то же время, массовое выявление неспецифических реакций на туберкулин, по-прежнему создают серьёзную проблему в диагностике туберкулеза.

По официальной статистике Департамента ветеринарии МСХ России, в период с 2000 по 2015 год, заболеваемость туберкулезом крупного рогатого скота отмечалась в 61 из 89 регионов России. Количество неблагополучных пунктов составляло 203, вновь выявленных 163 с коэффициентом неблагополучия – 32640 голов крупного рогатого скота. Фактически туберкулез занимает второе место в инфекционной патологии крупного рогатого скота (после лейкоза). Положение усложняется и непредсказуемостью последствия мирового экономического кризиса, социальные составляющие которого (стрессы, бедность, миграции и т.д.) могут иметь к проблеме туберкулеза прямое отношение.

По данным ВОЗ в России заболеваемость на 100 тыс. населения составляет более 87 человек, показатели по Дагестану в 1,5 раза выше (Авилов В.М. 1992; Гусейнов Г.К. 1996; Нуратинов Р.А. 1999, 2001). Согласно прогнозу к 2020 году заболеваемость туберкулезом может достигнуть 117,6 человек, а смертность до 27,0 на 100 тыс. населения (Овдиенко Н.П. 2002). Г.К. Гусейнов (2013) пишет, что ни в одном регионе России нет более тяжёлого эпидемиологического положения, как в Дагестане. В республике только за 2012 год на 100 тыс. населения заболеваемость составила 92,4 человек, болезненность 306,2, смертность – 20,2.

В эпизоотическом отношении привести хотя бы приблизительные цифры о заболеваемости животных туберкулёзом в республике не представляется возможным, из-за несовершенства статистических данных, и нестыковки в работе науки и практики. В 2015 году зарегистрирован один неблагополучный пункт с высоким коэффициентом очаговости, что является показателем запоздалой диагностики.

Достаточно сказать, что в хозяйствах расположенных во всех природно-климатических зонах республики, постоянно выявляются большое количество реагирующих на туберкулин животных. В связи с этим представляет интерес изучение эпизоотического процесса туберкулёза крупного рогатого скота в регионе и разработка научно обоснованной системы мер борьбы с учётом сложившихся местных условий.

Серьезной проблемой по профилактике и ликвидации туберкулеза являются неспецифические реакции на туберкулин, вызываемые атипичными микобактериями (Найманов А.Х. 1980, 2006, Журнакова М.А. 1964, Каграманов А.И. 1963, Контримавичус Л.М. 1966, Козин А.И. 1987, Манукян З.К. 1955, Мартма О.В. 1978, Овдиенко Н.П. 1980, Савов Н. 1994, Сысоев В.Н. 1985, Харитонов М. В. 1983, Ходун М. М. 1990, Шаров А.Н. 1989, Шуревский В.Е. 1985, Asselineau С. 1978, Wolinsky Е. 1988).

Имеются сообщения о сенсбилизации макроорганизма к туберкулину нокардиями и родококками и считают целесообразным создание из них моноаллергенов для дифференциации неспецифических реакций на туберкулин (Нестеренко О.А. 1978, 1982, Нуратинов Р.А. 1998, Azuma J., 1970).

В тоже время, несмотря на многочисленные сообщения о близкородственности коринебактерий с микобактериями (Баратов М.О. 2001, 2002, 2003, 2008, 2010, Бердичевская М.В. 1983, Нестеренко О.А. 1988, 1985, Нуратинов Р.А. 2004, Ridll М. 1987), вопрос о возможной сенсбилизации ими макроорганизма все еще остается нерешенным.

В связи с изложенным, изучение эпизоотического процесса туберкулеза крупного рогатого скота в условиях реформирования сельского хозяйства, этиологии парааллергических реакций и их дифференциация, а также совершенствование методов диагностики, являются актуальной проблемой, требующей своего научного разрешения.

**Цель и задачи исследований.** Изучить эпизоотическую ситуацию по туберкулезу крупного рогатого скота в РД и совершенствовать метод диагностики этой болезни в условиях реформирования сельскохозяйственного производства.

**Для разрешения указанной цели были поставлены следующие задачи:**

- изучить особенности эпизоотического процесса туберкулёза крупного рогатого скота в республике Дагестан за последние 55 лет;
- разработать лабораторный регламент изготовления и стандартизации аллергенов из микроорганизмов близкородственных к микобактериям и изучить сенсibiliзирующие свойства к ППД-туберкулину;
- предложить способ дифференциации аллергических реакции на туберкулин у зараженных коринебактериями животных;
- разработать новое средство диагностики для дифференциации аллергических реакции на ППД-туберкулин для млекопитающих у крупного рогатого скота на основе микобактериоподобных микроорганизмов;
- усовершенствовать и предложить универсальную питательную среду для коринебактерий и микобактериоподобных микроорганизмов;
- разработать и предложить научно обоснованную систему мер борьбы.

**Научная новизна.**

Впервые: - изучены эпизоотические особенности туберкулезу КРС в республике с учетом природно - климатической зональности;

- установлено распространения коринебактерий, нокардий и родококков в объектах внешней среды и в биоматериале;

- определена степень распространения парааллергических реакций у крупного рогатого скота;

- получен и предложен в практику сенситин из коринебактерий для диагностика коринебактериозных инфекций. (Патент №2592372 «Способ диагностики коринебактериоза и ассоциативных с коринебактериями инфекции у животных» от 29 июня 2016 г.);

- сконструирован аллерген из атипичных микобактерий КАМ (*M.scrofulaceum* №12-С и *M.intracellulare* №13-Н) и коринебактериозного сенситина (*Corynebacterium xerosis* N1911). (Патент на изобретение №2409387 «Комплексный аллерген для дифференциации аллергических реакций на ППД-туберкулин для млекопитающих» 20 января 2011 г.);

- создан комплексный аллерген из атипичных микобактерий и микобактериоподобных микроорганизмов, внесением в КАМ (*M.scrofulaceum* №12-С, *M. intracellulare* №13-Н), нокардий (*N.asteroides* ВКМ Ас 1077), родококков (*R. bronchialis* ИМВ Ас) и коринебактериозного сенситина (*Corynebacterium xerosis* N1911). (Положительное решение на выдачу патента).

- определена и усовершенствована среда для изолирования коринебактерий на основе геотермальной воды. (Патент №2588670 «Питательная среда для культивирования коринебактерий» от 07 июня 2016);

- создана универсальная среда (М-10), для углеводородокисляющих микроорганизмов (коринебактерий, нокардий и родококков). (Положительное решение на выдачу патента).

Разработаны методические рекомендации: «Борьба с туберкулёзом крупного рогатого скота в РД» (21.05.2002); «Мероприятия по оздоровлению хозяйств от туберкулёза» (23.12.2009); «Диагностика, профилактика и меры борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота в Дагестане» (25.03.2009); «Коринебактерии» (Общая характеристика, идентификация, методы выделения и генетические свойства)(9.02.2010). Издана монография «Коринебактерии» (2011 год).

Комплексный аллерген для дифференциации аллергических реакций на ППД-туберкулин для млекопитающих, а также монография «Коринебактерии» награждены дипломами Республиканского выставочного – маркетингового центра «Дагестан-ЭКСПО».



**Теоретическая и практическая значимость** диссертационной работы заключается в возможности теоретического и практического использования моноаллергенов из микобактериоподобных микроорганизмов для дифференциации неспецифических реакций на туберкулин, вызванных близкородственными микроорганизмами, а также использования усовершенствованных и универсальных питательных сред для изолирования коринебактерий и углеводородокисляющих микроорганизмов. Полученные данные в ходе выполнения исследований по теме диссертационной работы служат дополнительным материалом для научно-практической деятельности на факультете ветеринарной медицины в учебном процессе по специальности - 36.05.01 «Ветеринария» ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный аграрный университет им. М.М. Джамбулатова», а также в ветеринарных лабораториях.

#### **Методология и методы диссертационного исследования**

Основой методологии исследования явилась научно обоснованная постановка проблемы разработки и стандартизации аллергенов из микобактериоподобных микроорганизмов (коринебактерий, нокардий и родококков), расширения антигенной структуры КАМ, эффективности применения их в дифференциации неспецифических реакции на туберкулин, а также определение и усовершенствование питательной среды для излирования коринебактерий и создание универсальной среды для микобактероподобных микроорганизмов (М-10), подтвержденные патентами РФ на изобретение, отражающих полезность и достоверность. Созданная в результате выполнения диссертации экспериментальная база данных позволяет сформулировать новые рекомендации, кроме того, полученные практические результаты дополняют и развивают теорию.

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

- эпизоотический процесс по туберкулезу крупного рогатого скота на территории республики характеризуется значительным распространением, длительным неблагополучием хозяйств и наличием большого количества реагирующих на туберкулин животных;
- особенностью проявления туберкулеза является высокая инфицированность, зависящая от вертикальной зональности, широкое распространение атипичных и микобактериоподобных микроорганизмов в природе, а также перекрестная циркуляция микобактерий в организме человека и животных;
- в этиологии неспецифических реакций важную роль играют коринебактерии, нокардии и родококки, что показывает высокая степень интенсивности перекрестных реакций;
- моноаллергены, а также комплексный аллерген из микобактериоподобных микроорганизмов показывают значительное превосходство по чувствительности и специфичности при дифференциации неспецифических реакций, вызванных гомологичными микроорганизмами;
- универсальная питательная среда (М-10) для углеводородокисляющих микроорганизмов на основе геотермальной воды и усовершенствованная среда Бучина для изолирования коринебактерий, показали практическую значимость и диагностическую ценность на фоне высокой активности ингибирующих свойств, что позволяет существенно сократить время проведения лабораторных исследований.

**Степень достоверности.** О достоверности полученных результатов работы свидетельствует значительный объем исследований, проведенных на достаточном количестве животных в лабораторных, а также в практических условиях, с использованием апробированных методик получения аллергенов и питательных сред на специальном оборудовании в сертифицированных лабораториях. Объективность научных положений и выводов

подтверждается применением биометрической обработки экспериментальных данных. Результаты исследования опубликованы в рецензируемых источниках и апробированы на специализированных научных конференциях.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены на научно-практических конференциях: «По охране природы» (Махачкала 2001); «Координационного совещания и конференции» (Омск 2001г); «Актуальные проблемы туберкулеза» (Махачкала 2002 г.); «Инфекционные болезни в регионах Северного Кавказа: эпидемиология, лабораторная диагностика и профилактика» (Махачкала 2002 г.); «50-летию Дагестанской противочумной станции» (Махачкала, 2002г); «Проблема ветеринарной медицины в условиях реформирования сельскохозяйственного производства» (Махачкала, 2003 г.); «Научное обеспечение ветеринарного обслуживания животноводства в условиях реформирования животноводческого производства» (Вологда 2007г); « Молодые учёные – вклад в реализацию национального проекта "Развитие АПК"» (Махачкала 2007г); «Образование, наука, инновационный бизнес сельскому хозяйству регионов» (Махачкала 2007г); « Основные проблемы ветеринарной медицины и стратегия борьбы с заболеваниями сельскохозяйственных животных в современных условиях» (Махачкала 2007г); «Достижения ветеринарной науки и практики – сельскохозяйственному производству» (Махачкала 2008г); «Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы на основе инновационных достижений» (Новочеркасск 2009г); «Современные проблемы и перспективы развития аграрной науки» (Махачкала 2010г); «Современные проблемы, перспективы и инновационные тенденции развития аграрной науки» (Махачкала 2010г); « Проблемы развития АПК региона» (Махачкала 2010г); «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки» (Владикавказ 2013 г); «Современные проблемы и перспективы развития ветеринарной науки» (Махачкала 2014); ученых и

межлабораторных советах Прикаспийского зонального НИВИ (Махачкала 2000-2005).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 35 научных работ, из них 11 - в изданиях, включенных в перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук; в том числе 3 патента, 3 методические рекомендации, 1 монография.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 271 странице компьютерного текста и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, собственные исследования, заключение, выводы, практические предложения, библиографический указатель использованной литературы, приложения. Работа иллюстрирована 45 таблицами, 3 рисунками, 2 картами-схемами, 7 фотографиями, 1 графиком. Список использованной литературы включает 375 источника, из которых 89 иностранных.

# ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

## 1. Обзор литературы

### 1.1 Краткая историческая справка

Туберкулёз известен с древних времён. Следы туберкулезных поражений обнаружены у египетских мумий (Smith et Ruffer), в Китае туберкулез в качестве самостоятельной болезни был известен уже в VI в. до н.э. Классическое описание симптомов болезни (нагноение легкого, понижение секреции и экскреции, кровавый кашель) дал Гиппократ. На инфекционный характер туберкулеза впервые обратил внимание итальянец Джероламо Фракасторо (1546). Впервые туберкулезные узелки описал в XVII веке анатом Silving, он же применил термин «туберкул». Заразив животных туберкулезной козеозной массой, взятой из человеческих трупов, Villemin в 1865 году, доказал инфекционный характер туберкулеза.

Истинная природа болезни была открыта к концу XIX века, 24 марта 1882 года на заседании Берлинского физиологического общества немецкий врач - бактериолог Р. Кох сделал доклад «Об этиологии туберкулеза», где сообщил всему миру о величайшем открытии – найден возбудитель туберкулеза, которого впоследствии в честь ученого назвали «палочка Коха», который в последствии был отнесён к роду *Mycobacterium* (Лейман и Нойман, 1896). В последующем Н.Ф. Гамалей (1891), Маффучи (1890), Т. Смит (1898) определили виды: человеческий, бычий и птичий. В 1937 году открыт и мышинный вид.

Согласно определителю бактерий (Берги, 1982) род микобактерии отнесены к порядку Actinomycetales, семейству Mycobacteriaceae, включением 36 видов, 12 из которых представляют опасность для животных и человека: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. leprae*, *M. africanum*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. ulcerans*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. fortuitum* и *M. chelonae*.

Кислотоустойчивые микобактерии по E. Runion (1959) делятся на четыре группы: фотохромогенные – *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. marinum* и *M. simiae*; скотохромогенные – *M. gordonae*, *M. flavescens*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. thermoresistibile*; нефотохромогенные – *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gastri*, *M. farcinogenes*, *M. paraffinum*, *M. xenopi*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. ulcerans*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. shimoidei*; быстрорастущие – *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. chitai*, *M. fallax*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M. agri*, *M. phlei*, *M. vaccae* и другие.

В то же время указанная классификация имеет существенные недостатки, она не отражает генетическое родство микобактерий и их патогенность. Подавляющее количество кислотоустойчивых микобактерий имеют общие родоспецифические данные с микобактериями туберкулёза, [88,90,120,136,165,299,310,327,334,350,329,366]. В то же время, отличаются от них по культуральным, хемотаксономическим и патогенным свойствам. [275,295,306,360,373].

Микобактерии в организме встречаются в разных формах: в виде стабильных и нестабильных L-форм, протопластов, сферопластов, [4,9,10,15,68,78,79,96,219,308,321,367,345,370], которые при благоприятных условиях могут реверсироваться в классические формы и вызвать туберкулез.

В 1888 году Гельманом Х.И. был предложен туберкулин для аллергической диагностики туберкулеза. С этого момента были начаты целенаправленные исследования крупного рогатого скота на предмет изучения распространенности болезни и разработки мер борьбы.

Несмотря на это, туберкулёз и по сегодняшний день остается проблемой во многих странах мира, для решения которой требуется усилия государственных и ветеринарных служб. Тому подтверждение – неблагополучие большинства стран Евразии и Африки [2,13,163,201,176], областей Российской Федерации [172,201,259]. По данным международного эпизоотического бюро и всемирной организации здравоохранения в мире от

туберкулеза умирают больше людей, чем от чумы, холеры, малярии и СПИДа, а больше половины населения - носители микобактерий. По распространению туберкулез уступает только респираторным болезням [81,132,133,134].

Устойчивость микобактерий к физическим факторам высокая. Растут при температуре 37-38°C, птичий вид - 40-42°C, переносят низкие температуры - 269°C [63], кипячение убивает моментально. Выживают: в биоматериале – до 503 дней [12,147,318]; в макроте – 5-6 месяцев [109,372]; в фекалиях – до 5 месяцев [129,144,199,215,311]; в воде – до 18 месяцев [186,224]; в молоке, сырах, масле и других продуктах животноводства могут сохраняться длительное время [124,144,284,303]. Солнечные лучи губительны для микобактерии туберкулеза: 50°C убивает их через 10 ч., 55°C – через 4 часа [106, 107,278].

## **1.2 Особенности эпизоотического проявления туберкулеза крупного рогатого скота**

Туберкулёз широко распространён во всех регионах России, стационарно неблагополучны республики Северного Кавказа.

Комплекс мероприятий по профилактике и ликвидации туберкулеза предусматривает учёт географических, природно-климатических, экономических, этнографических и других факторов прямо или косвенно влияющие на эпизоотическую ситуацию по туберкулезу [7,8,14,16, 59,74, 118].

Основным источником распространения микобактерии в объектах внешней среды являются больные туберкулезом животные, в секретах и экскретах которых содержатся микобактерии. В кале больного туберкулезом животного почти всегда содержатся микобактерии [18,86,55,99,108,157,211,245,307]. Установлено, что больное животное может выделить с калом за сутки до 37 млрд. бактерий. Среднее число патогенных

микобактерий туберкулеза в 1 мл молока может составить около 5 млн. [34,101,146,149,210,214,319].

Достаточно серьезную опасность для здоровых животных представляют носители измененных форм микобактерий, поскольку в естественных условиях возможен переход микобактерий туберкулеза одного типа в другой. Среди разновидностей изменчивости микобактерий следует назвать L-формы, фильтрующие формы, сферобласты, протобласты, латентный микробизм, которые при определенных условиях могут успешно реверсироваться в классические формы и вызвать туберкулез. Следовательно, при выявлении у крупного рогатого скота латентной инфекции в хозяйствах необходимо проводить те же мероприятия, что и при обычном классическом туберкулезе [8, 120,219,293,315,320].

В распространении туберкулеза огромную роль играют и дикие животные. Туберкулез зарегистрирован у 57 видов диких животных и 40 видов птиц. Исследованием 25 трупов кенгуру в Австралии в 18 случаях выделен *M. bovis* [298,308]. Похожие результаты получены у антилоп в Кении, у косуль - Бразилии, зебувидного скота – Южной Африке [312, 331,336,342,356]. Микобактерии также выделены из организма диких кабанов [124], маралов, пятнистых оленей [146, 346] и дождевых червей [12]. По мнению Н.П.Овдиенко (1989), это болезнь особенно распространена в странах Азии, Южной Америки и Африки. При этом во всем мире ежегодно заболевает свыше 6 млн. голов диких животных.

Многочисленные литературные данные ученых различных стран мира свидетельствуют о весьма значительной миграции микобактерий бычьего типа на человека, причем, степень этой миграции находится в прямой зависимости от благополучия ферм. Так, в Дагестане изолируемость бычьего типа от человека составляет 22,4% [81,193], в Якутии – 15,2% [143,264, 266]. По многочисленным данным *M. bovis* выделен от коз [317,338,359], овец [235, 364], уток, гусей, лебедей, свиней [158,369]. *M. tuberculosis* мигрирует на 14 видов животных, в частности, на антилоп гну, коз, кошку, лошадь, льва, медведя, обезьяну, осла, свинью, слона и собаку [89, 214, 305,361].



Факт заражения крупного рогатого скота туберкулезом от больных людей установлено многими учеными, при этом изменения туберкулезного характера в органах обнаруживается сравнительно редко, но микобактерии могут, выделяется с молоком [34]. Среди выделенных от крупного рогатого скота культур возбудителя туберкулеза на долю человеческого вида приходится в Казахстане от 2 до 19,5%, в Новосибирской области – 6,2%, в Воронежской области -5,3% [71, 120, 214,221,357,358, 228].

При туберкулезе к числу обязательных факторов возникновения болезни относится источник инфекции, поскольку в них туберкулезные микобактерии могут размножаться и оставаться в длительное время жизнеспособными. Большое количество микобактерий попадают во внешнюю среду через дыхательные пути и через желудочно-кишечный тракт, заражая корм, воду, почву, помещение и т.п. [17, 105,304]. Они выделяются из организма со слюной, истечениями из носа, влагалища, со спермой, молоком [34, 211, 226, 285,290]. Источником возбудителя туберкулеза также является необеззараженное животное сырье, полученное от вынужденно убитых или павших животных, где возбудитель сохраняется до 475 дней [286,375].

Кислотоустойчивые или атипичные (анормальные) микроорганизмы составляют особую группу, значение которых в патологии животных и человека полностью еще не выяснено. Имеются многочисленные сообщения, что отдельные виды указанных микобактерий вызывают сходные с туберкулезом заболевания - микобактериозы [75,87,95,115,129]. Так, по данным различных исследователей, в большинстве странах мира микобактериозы у людей составляют 0,4-1,2% заболеваний, вызываемых возбудителем туберкулеза [157,247]. Часто выявляются атипичные микобактерии и от сельскохозяйственных животных, так их выделено от 40 до 48,6% случаев из материала от реагирующих на туберкулин крупного рогатого скота в благополучных по туберкулезу хозяйствах.

При изучении атипичных микобактерий предложено несколько классификаций. Наибольшее признание получила классификация Е.Раньона (1959). На основании определения скорости и характера роста культур на

средах и способности их к пигментообразованию подразделил на 4 группы [95,102,115, 332,335]. Значение данных микроорганизмов в инфекционной патологии животных до конца не определено. В одних случаях они были причиной заболевания, в других – выделены от совершенно здоровых животных. Так, по данным А.А. Солоненко (1982) в 82,2% случаях туберкулезоподобные изменения у свиней были обусловлены микобактериями III группы по классификации Раньона. А. С. Донченко (1989) выделил *M. avium-intracellulare* в 18,7% случаях от реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота, в 12,5% - от свиней и в 68,8% - от птицы.

В последнее время увеличивается количество случаев заболевания людей, причиной которого являются кислотоустойчивые микобактерии. Больше всего таких заболеваний описано в США, также они выявлены в Англии, Бельгии, Италии, Канаде и других странах. По данным разных авторов такие микобактерии в среднем составляли от 0,42 до 30 % случаев заболевания [100,329,324,371,373].

Из анализа исторических данных по эпизоотологии туберкулеза следует, что эпизоотический процесс по этой болезни колеблется волнообразно, то затихая, то разрастаясь, реагируя на все изменения, происходящие в стране и в мире целом. Несмотря на достаточно хорошие успехи в области профилактики и диагностики, туберкулез никогда не был полностью ликвидирован. В течение последних десятилетий в России проводится большая работа по изучению и совершенствованию диагностики туберкулеза животных, в частности дифференциальной диагностики. В новых условиях развития животноводства необходимы новые методы борьбы с этим заболеванием с учетом перехода значительного количества животных в частные руки.

### 1.3 Диагностика и неспецифическая сенсibilизация при туберкулезе

Своевременное выявление и выделение из стада больных животных являются одним из основных мероприятий при оздоровлении неблагополучных хозяйств. Постановка диагноза на туберкулез представляет большие сложности, особенно при установлении в хозяйстве первичного диагноза. Поэтому используют несколько методов, аллергический, патологоанатомический, бактериологический, при необходимости биологический. Кроме того, необходимо в достаточной степени собрать эпизоотологические и эпидемиологические данные, в том числе о благополучии местности по туберкулезу, о времени завоза животных в хозяйство, возможности контакта со скотом других хозяйств и находящихся в личном пользовании, о благополучии по туберкулезу животных других видов, о результатах исследования на туберкулез работников животноводства.

Основными, массовыми и общепринятыми методами исследования на туберкулез являются внутрикожная (у овец, коз и пушных зверей – пальпебральная, у лошадей – глазная) туберкулиновая проба, патологоанатомическое и бактериологическое исследование[274,281,282].

Аллергический метод является наиболее признанным в прижизненной диагностике туберкулёза, хотя и не лишена недостатков. В своё время, для введения туберкулина предлагались множество методов (кожная, интрапальпебральная и пальпебраная пробы, ринореакция, уретро и вагинальная реакция, адсорбция туберкулина в прямой кишке, эпидермическая реакция и другие) но большинство из них не нашли практического применения.

Заболевание подтверждается результатами патологоанатомического вскрытия, а при их отсутствии – положительными результатами лабораторных исследований. Бактериологическому исследованию подвергают биоматериал от животных в случае отсутствия у них свойственных туберкулёзу изменений. В лабораторию направляют молоко,

мокроту, от убитых животных – лимфатические узлы (заглоточные, околоушные, подчелюстные, бронхиальные, средостенные, брыжеечные). От птиц – печень, селезёнка, легкие, яичники или целые тушки. Срок бактериологического исследования в лаборатории не должен превышать трех месяцев. Диагноз на туберкулёз считается установленным при выделении от животных микобактерий бычьего или человеческого видов, от птиц – птичьего вида или при получении положительных результатов биологической пробы.

В благополучных хозяйствах, реагирующих на туберкулин животных, дополнительно исследуют офтальмо или внутривенной туберкулиновой пробой, причем туберкулин вводят в день учета реакций на внутрикожное введение туберкулина. Положительно реагирующих подвергают диагностическому убою. Диагноз считается установленным при обнаружении изменений туберкулёзного характера. При отсутствии таковых, берут материал для бактериологического исследования и постановки биопробы. Диагноз подтверждается выделением микобактерий бычьего или человеческого видов, а также положительными результатами биопробы.

В случае отсутствия реагирующих, всех (включая ранее реагировавших на внутрикожную пробу) животных, через 40-45 дней проверяют симультанной аллергической пробой с применением ППД-туберкулина и КАМ и по интенсивности реакции определяют характер сенсбилизаций. Если у животных утолщение кожной складки на КАМ выражена в большей степени, нежели на ППД-туберкулин, стадо считается благополучным. В случае выявления животных с более интенсивной реакцией на ППД-туберкулин, чем на КАМ, их подвергают диагностическому убою, последующем проведении бактериологических исследований и биопробы. При отрицательных результатах исследуемое поголовье также считают благополучным по туберкулёзу. За такими животными с учетом результатов ветеринарно-санитарной экспертизы и аллергических исследований следует осуществлять контроль.

Существуют противоречивые мнения о необходимости учета характера припухлости на месте введения туберкулина. Холодная, плотная, ограниченная припухлость с увеличением кожной складки на месте введения туберкулина, продолжительностью более 72 часов, может появиться у животных с пониженной реактивностью, или при наличии воспалительных процессов в коже, при неправильном введении туберкулина и т.д. Следовательно, при учете результатов аллергической пробы нужно придерживаться стандартной схемы проявления реакции в виде разлитого отека, которая сопровождается повышением местной температуры, как правило, не имеющей четких границ с окружающей тканью и болезненностью воспалённого участка.

На проявление и характер реакций может также повлиять и общее физиологическое состояние организма, условия содержания и кормления, время года и внешние факторы. Поэтому в целях контроля благополучия поголовья необходимо проведение во всех хозяйствах плановых туберкулинизации, коров и быков – два раза в год (весной и осенью), лошадей, овец, коз в зависимости от эпизоотической обстановки.

При выявлении в благополучном по туберкулёзу стаде свиней, овец, коз, реагирующих, для диагностического убоя отбирают 3-5 животных с наиболее выраженными реакциями. Параллельно берут материал для бактериологического исследования и биопробы. Обнаружение изменений туберкулёзного характера в органах, а также изолирование микобактерии бычьего или человеческого видов или положительные результаты биологической пробы, указывают на туберкулёз.

Если в хозяйстве у реагировавшей на туберкулин, а также павшей или убитой на мясо птицы, обнаруживают изменения туберкулёзного характера, проводят микроскопию мазков и при положительных результатах, диагноз считают установленным.

У лошадей, буйволов, ослов, собак диагноз на туберкулёз устанавливают на основании результатов бактериологических, патологоанатомических и аллергических исследований.

В благополучных хозяйствах, положительно реагирующих на туберкулин животных, считают подозреваемыми в заражении туберкулезом. В неблагополучных хозяйствах таких животных признают больными, независимо от результатов патологоанатомического вскрытия и бактериологических исследований.

Имеются многочисленные данные о том, что у животных, реагирующих на туберкулин в благополучных хозяйствах, диагноз на туберкулез не подтверждается бактериологическим методом. В отдельных странах процент животных с неспецифическими реакциями достигает до 50 от общего числа исследованных, а в России – от 6 до 52,8 [154,225,229,230,236, 246].

В настоящее время доказано, что основной причиной неспецифических реакции на туберкулин является сенсibilизация животных атипичными и сапрофитными микобактериями [91,97, 102, 185, 202, 227,279, 341, 353]. По мнению М. К. Юсковца причиной сенсibilизации могут быть также микобактерии паратуберкулеза, бруцеллы, а также различного рода гноеродные процессы в организме животных. В этом случае, по данным автора реакция сопровождается образованием твердых округлых, резко контурированных, малоблезненных припухлостей, которые не меняются даже через 10 суток.

Некоторые исследователи сообщают, что неспецифические реакции могут возникать у животных больных фасциозом, дикроцелиозом и эхинококкозом [117, 224, 244, 278, 343, 352]. Однако работами других ученых было доказано, что указанные причины не являются причиной неспецифических реакций на туберкулин [6, 110, 150, 209, 270, 272, 347, 362].

Вместе с тем неспецифичность реакции с достоверностью можно доказать лишь после диагностического убоя реагирующих животных, на основании результатов вскрытия и бактериологического исследования материала.

Аллергический метод с ППД-туберкулином для млекопитающих является основным в прижизненной диагностике туберкулеза животных.

Однако, выявление из года в год массовых неспецифических реакции на туберкулин делает результаты этой пробы ориентировочными, поэтому для дифференциации неспецифических реакций на туберкулин, используют симультанную пробу ППД-туберкулином для млекопитающих и КАМ и по интенсивности реакций определяют характер сенсбилизаций [113,116,205,224,365].

В то же время, дифференцирующая способность данной пробы высокая в случаях сенсбилизации макроорганизма атипичными микобактериями. По литературным данным, изолируемость указанных микроорганизмов от животных составляет, от реагирующих в 46,4%, случаев, от нереагирующих – 48,8% [222,260]. В этой связи проведения видовой идентификации микроорганизмов от реагирующих на туберкулин животных необходимо для уточнения диагноза.

В связи с этим представляют интерес таксоны, имеющие родство с микобактериями в частности коринебактерий, нокардий и родококки, которых по многочисленным данным изолируют от реагирующих на туберкулин животных [138, 193]. Не смотря на близкородственность по культуральным, физиологическим, хемотоксономическим, биохимическим и т.д. свойствам, в доступной литературе нам не удалось найти работы по изучению сенсбилизующей способности данных таксонов к туберкулину, в частности по коринебактериям. Имеются малочисленные сообщения о наличие такой способности у нокардий и родококков [131,179, 344]. Выделяются от животных, реагирующих на туберкулин, нокардии в 14,5% случаях [138,191], родококки -26,3% [98,192,193].

По данным литературных источников при определении родственных отношений между микроорганизмами большое значение имеет химический состав клеточных стенок [177,179,198,351]. Установлено, что по содержанию сахаров (типы А-Д) и изомеров диаминопимеленовой кислоты (ДПК) легко удаётся установить I-IV типы клеточных стенок [177,180,354, 364], данные параметры могут быть использованы и при идентификации нокардий [365] коринебактерий [304,339]. Установлено что, бактерий родов

Micropolispora, Mycobacterium, Pseudonocardia, Rhodococcus, Sacharopolispora, Corynebacterium, Caseobacter и таксон "aurantiaca" в качестве идентифицирующих признаков содержат мезо-ДПК, арабинозу и галактозу, определяющие IV тип клеточной стенки [300, 312, 331, 334, 338, 339, 355]. Однотипной и постоянной является и состав пептидогликана, перечисленная по классификации в группу А [292].

Отличительным признаком коринебактерий от других микобактериоподобных микроорганизмов (микобактерий, нокардий и родококков) является наличие в пептидогликане N - ацетильной группы, где мурамовая кислота замещена N – гликолильной [288, 306]. Основными компонентами стенки микобактерий [320] и родококков [311] является миколовая кислота, арабиногалактан и пептидогликан. В клеточных стенках нокардий обнаружены нокардомиколовая и гликолевая кислоты [180, 304, 314, 326, 351], чем они и отличаются от микобактерии и родококков. По данным [293, 297, 306], пептидогликан, как основной компонент клеточной стенки, состоит из гликолилмурамовой кислоты и диамированных субъединиц. Наличие значительного количества липидов 30-60% к сухой массе, [126,359] в клеточной стенке являются идентификационным признаком данных микроорганизмов, количественное содержание и качественный состав которых могут быть использованы при видовой идентификации [354]. Компоненты химического состава микроорганизмов представлены в (таблице 1).

Таблица 1

Компоненты химического состава микобактерий, нокардий, родококков и коринебактерий

Компоненты химического состава	Выявлен (+), не выявлен (-)			
	микобактерии	нокардии	родококки	коринебактерии
1	2	3	4	5
Нуклеотидный состав ДНК	62-74 % ГЦ	63-74 % ГЦ	62-73 % ГЦ	51-61 %
1	2	3	4	5
Размер генома	3-5,5 x 10 <sup>9</sup> Д		3,1-4,9 x 10 <sup>9</sup> Д	
Тип клеточной стенки	IV	IV	IV	IV
Тип пептидогликана	гр. А	гр. А	гр. А	гр. А
Основные компоненты клеточной				



Миколовая кислота	+	+	+	+
Нокардомиколовая кислота	-	+	-	
Арабиногалактан	+	+	+	+
Мукопептид	+	+	+	
Микобактины	+	-	-	-
Нокобактины	-	+	+	-
Липиды: - липид LCN-A	-	+	+	+
- миколовые кислоты с числом ат.С	C60-90	C36-60	C32-66	C22-28
при пиролизе освобождают жирные кислоты				
с числом атом С.	C22-26	C12-16	C10-18	C8-18
Прямоцепочечные жирные кислоты:				
Насыщенные	C8-26	C16-18	C16-18	C16-18
Длинноцепочечные:				
- спирты (нокардолы)	-	+	-	
- кетоны (нокардоны)	-	+	-	
Туберкулостеариновая кислота	+	+	+	-
Флеевые кислоты	+			
Маноеновые кислоты	+			
Фтиеновые кислоты	+	-	-	
1	2	3	4	5
Гликолилмурамовая кислота	+	+	+	
Гликолевая кислота	-	+	-	
Гликоген	+			
Воск – фтицеролдимикоцерозат	+	-	-	
Гликолипиды: - мономиколат трегалозы	+	+	+	+
- димиколат трегалозы (корд-фактор)	+	+	+	+
Пептидогликолипиды: воск Д	+	+	+	
- Микозид С	+			
- микозид Д	Д			
Пептидолипиды	+	+	+	
Фосфолипиды (ФИ, ФЭ,ДФГ, ФИМ)	+	+	+	+
Нейтральные липиды: - пигменты, менахиноны, триглицериды, истинные воска	+	+	+	
Основной компонент менахиноновой фракции	МК-9 (Н <sub>2</sub> )	МК-8 (Н <sub>4</sub> )	МК-8 (Н <sub>2</sub> )	МК-8 (Н <sub>2</sub> ) МК-9 (Н <sub>2</sub> )
Полисахариды: арабиногалактан	+	+		+
- арабиноманнан	+	+		+
- маннан	+	+		+
- глюкан	+	+		+
- полиметилполисахариды	+	+		+
- липополисахарид (МГЛП)				

Данные таблицы 1, показывают идентичность подавляющего большинства компонентов химического состава у микобактериоподобных микроорганизмов: наличие микобактинов у микобактерий [291, 293, 350]; содержание большого количества атомов углерода в миколовой кислоте [307, 325], фтиеновых кислот, воска фтицеролдимикоцерозатных бактерий [330]; остаточного таксономического признака МГЛП [65]; наличие у нокардий и родококков нокабактинов [314, 324], нокардомиколовой кислоты [295],

липидов LCN – А [301, 302], гликолевой кислоты [367], длинноцепочечных спиртов [314].

Нужно иметь виду, что на содержание и структуру большинства химических компонентов могут оказать влияние температура и состав питательной среды. Так, у нокардий при 17°C значительно повышается содержание ненасыщенных, тетраеновых миколовых кислот, чем при 50°C [296, 300]. *M. smegmatis* имеет в миколовой кислоте углерод [C<sub>63</sub>], а после облучения действием ультрафиолетовых лучей, снижается - C<sub>51</sub> [312, 325]. Состав отдельных фосфолипидов зависит от возраста, условий культивирования [65,119, 304] метода индикации [10]. Поэтому, важно при идентификации штаммов целесообразно использовать одинаковые условия выращивания, пользоваться стандартными методами анализа [313, 329] и определением липидного состава [64].

Известно, что патогенность нокардии обеспечивается липидным составом, а вирулентность β - фракцией миколовых кислот [304, 305], водорастворимые соединения (гликоген, глюкан, арабиноманнан, маннан) и некоторые липополисахариды, полипептид - полимер L - глутаминовой кислоты [296, 298, 310], воск Д и корд-фактор обладают иммунологической и противоопухолевой активностью [119, 313, 321, 324]. Перечисленные данные показывают близкое родство микабактериоподобных микроорганизмов по химическому составу.

Вместе с тем, близкое генетическое родство между быстрорастущими микобактериями, нокардиями и родококками отмечается и по гибридизации ДНК - РНК, а коэффициент S<sub>AB</sub> *M.flei* и *R.spp.* является показателем видовой близкородственности в пределах одного рода [130,322]. Сравнительная характеристика микроорганизмов по основным признакам представлена в (таблице 2).

**Характеристика микроорганизмов родов нокардий, родококков,  
микробактерий и коринебактерий**

Признаки	Наличие (+), отсутствие (-)			
	микобактерии	нокардии	родококки	коринебактерии
1	2	3	4	5
Отношение к кислороду воздуха	аэробы	аэробы	аэробы	аэробы ф/ анаэробы
Окраска по Грамму	«+»	«+»	«+»	+
Кислотоустойчивость	+п.	± ч. сл.	± ч. сл.	некислотоуст ойчивость
1	2	3	4	5
Подвижность	-	-	-	-
Образование спор	-	+	-	-
Полиморфизм	+	+	+	+
Образование мицелия: воздушного субстратного	±	±	+	-
	+	+	±	-
Пигментация	+	+	+	-
Анаэробное окисление глюкозы	-	-	+	±
Арильсульфатазная активность	±	+	-	-
Рост на индивидуальных алканах	±	+	+	±
Сенсибилизация макроорганизма	+	+	+	+
Наличие n-нитрофенолоксидазы	-	+	±	-
В – галактозидазы	БРМ +	+	+	-
Разложение этиленгликоля	БРМ -	+	+	-
Кислотоустойчивость после 4-х часовой экстракции пиридином	+	-	-	-

Условные обозначения: (+) – 80-100 % штаммов положительно по данному признаку;  
 (±) – 50-79 %; (+) – 15-49 %; «+» – 0-14 %;  
 п – полная,  
 ч – частичная  
 сл. – слабая кислотоустойчивость;  
 брм – быстрорастущие микобактерии.

Из материалов таблицы 2 видно, что все микобактериоподобные микроорганизмы имеют одинаковое отношение к кислороду (аэробы), одинаковую структуру клеточной стенки (грамположительны), сходность по отношению к кислотам (устойчивость, хот и в разной степени), не имеют органов движения, различаются по строению, образуют воздушный и субстратный мицелий, синтезируют пигменты. В то же время окисление глюкозы нокардиями в бескислородной среде и наличие спор не являются

чисто родоспецифическими данными, поскольку часто обнаруживаются шаровидные формы или фрагменты нитевидных клеток (*N.asteroides*, *R.egui*), напоминающие микобактерии [179]. Обнаруживаются микобактерии, с первичными и воздушными мицелиями [301, 302, 349] и высоким уровнем фенотипического сходства с быстрорастущими микобактериями и родококками [370]. Некоторые исследователи указывают на различие этих таксонов по составу менахинонов [333, 337, 339], имеются общения на близость их обнаруживаемые реакциями агглютинации, иммунодиффузии, иммуноэлектрофореза а также реакцией связывания комплемента [70,304, 305, 335]. В то же время, несмотря на биохимическое и биологическое сходство структур и свойств, у более чем 50 видов микобактерий, 20 видов нокардий и родококков, идентифицировать родовую принадлежность эпизоотических штаммов по изученным признакам не удаётся. Изученный признак, характерный для 80-100% видам одного рода, оказывается идентичным 50% штаммам другого рода. Поэтому, многие исследователи придерживаются мнения о необходимости объединения родов *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* и *Corynebacterium* в семейство *Mycobacteriaceae* Chester 1897 порядка *Actinomycetales* [181].

Огромную роль в сенсibilизации макроорганизма к туберкулину играет антигенный состав и серологические свойства микроорганизмов. Установлена антигенная связь микобактерии с нокардиозными антисыворотками [122,327], обеспечиваемая общим полисахаридом состоящий из арабинозы и галактозы [248, 303]. Из нагретого культурального фильтрата и клеточного экстракта *M.tuberculosis*, методом иммуноэлектрофореза (ИЭФ) выделены родо- и группоспецифичные антигены [135, 314], а также 14 антигенов, разделенные по степени специфичности на 4 группы: 1 группа - антигены общие для микобактерий, коринебактерий и нокардий [315, 329], остальные моноспецифические, характерные только данному таксону.

Общий группоспецифический антигена дает основание объединить рода *Mycobacterium*, *Corynebacterium* и *Rhodococcus* в одну серологически

гомогенную группу [61]. Подтверждением этому является, наличие перекрестных реакции на туберкулин у зараженных микобактериями, нокардиями и родококками морских свинок. Помимо этого, аналогичные реакции выявлены в реакции связывания компонента, реакции непрямой гемаглютинации, реакции торможения миграции лимфоцитов, реакции бласттрансформации и в реакции ризеткообразования с туберкулёзными антигенами в сыворотках крови, зараженных нокардиями и родококками кроликов [171,220, 313].

Антигенная структура микобактериоподобных микроорганизмов лучше выявляется более чувствительными и совершенными методами исследования. Так, например, метод определения фракции соникатов микобактерий H<sub>37</sub>RV, в градиентном электрофорезе в полиакриламидном геле, при исследовании в иммуноэлектрофорезе и кожных тестах у морских свинок, иммунизированных *M.tuberculosis*, *M.kansasii*, *M.intracellulare*, *M.scrofulaceum* и *M.fortuitum*, выявляет в каждом образце до 60 антигенов, однако, не позволяет получить моноспецифические антигены [143], а у *M.tuberculosis* до 30 антигенных компонентов [293, 316]. Вместе с тем не удается определить иммунобиологическое значение сыворотки и расшифровать химическую структуру антигенов у нокардии, хотя и содержат огромное количество перекрёстно-реагирующих антигенов. Иммунодиффузным методом установлено, что многие штаммы нокардий и родококков имеют до 3-х общих с микобактериями преципитирующих антигенов, 2 из которых идентифицированы как  $\alpha$  и  $\beta$ ,  $\alpha$  общие для микобактерий и нокардий, -  $\beta$  для многих родококков, микобактерий и единично для нокардий [335, 336]. У микобактериоподобных микроорганизмов выявлены общие преципитиногены X и Y [361].

Из выше изложенного материала следует, что микобактерии, коринебактерии, нокардии и родококки имеют сходство не только по составу и структуре клеточных оболочек, но и по наличию общих иммунологических, культурально - морфологических, биохимических и генетических свойств. Изученные данные показывают способность

указанных таксонов сенсibilизировать организм животных к туберкулину, что может проявляться неспецифическими реакциями на туберкулин. Перекрёстные аллергические и иммунологические реакции с гетероличными антигенами у зараженных животных на туберкулин и на сенситины из коринебактерий, нокардий и родококков, указывают на близкородственность антигенных структур. В то же время химическое строение и структура общей субстанции коринебактерий, микобактерий, нокардий и родококков способных сенсibilизировать макроорганизма к туберкулину, ещё недостаточно изучено. В этой связи представляется перспективным получение моноспецифических аллергенов из перечисленных микроорганизмов, и создание комплексного аллергена для дифференциации неспецифических реакций на туберкулин.

#### **1.4 Профилактика и меры борьбы с туберкулёзом**

В благополучных по туберкулёзу хозяйствах осуществляют комплекс профилактических мер, направленных на обеспечение ветеринарно-санитарной культуры, сохранение благополучия и недопущения заноса возбудителя извне. Животным должны быть созданы необходимые условия содержания, кормления и эксплуатации в соответствии с экстерьерными данными и технологической направленностью. Завоз животных из других хозяйств, а также внутривладельческие перегруппировки должны осуществляться строго с разрешения ветеринарных специалистов. Всех вновь поступающих животных, при наличии ветеринарного свидетельства, содержат на карантине и в течение 30 дней, их исследуют аллергическим методом и в случае установления благополучия переводят в общее стадо. В случае выявления реагирующих на туберкулин животных, проводят комплексное уточнение диагноза и при его подтверждении, поголовье подвергают убою.

При выгульном содержании не допускают контакт со скотом неблагополучных по туберкулёзу хозяйств и населённых пунктов. В случае появления признаков вызывающих подозрение на туберкулёз (потеря упитанности, признаки воспаления

легких, увеличение поверхностных лимфатических узлов), необходимо своевременно информировать ветеринарную службу. Весь обслуживающий животных персонал каждые 6 месяцев должны проходить медицинский осмотр (рентгеновское исследование). Ветеринарные и медицинские организации обязаны иметь информационную связь о случаях заболевания людей и животных туберкулезом.

Основой борьбы с туберкулезом является:

- выявление больных животных и сдача их на убой;
- выращивания здорового молодняка для замены;
- уничтожение возбудителя туберкулёза во внешней среде;
- обезвреживание продуктов животноводства, полученных от больных и подозреваемых в заражении туберкулезом животных.

При установлении неблагополучия местной администрацией по предоставлению главного ветеринарного инспектора района, в хозяйствах населенном пункте, ферме и тд. вводят карантинные ограничения и утверждают комплекс организационно-хозяйственных и ветеринарно-санитарных мероприятий по ликвидации очага заболевания, согласно утверждённому плану.

Больных животных изолируют, таврят буквой «Т» и в течение 15 дней сдают на убой, не зависимо от племенной и производственной ценности. Запрещается создание ферм-изоляторов для передержки таких животных.

Не допускается использования больных животных для получения молока и приплода для воссоздания стада. Исключают любые контакты больных животных с благополучным поголовьем на пастбище, водопое.

Вход, посторонним лицам, въезд транспорту на территорию хозяйства, а также вывоз животных и продукции, осуществляют строго с разрешения и под контролем ветеринарных специалистов.

При необходимости убой больных животных в хозяйстве проводят на оборудованной площадке с соблюдением мер обеспечивающих недопущения разноса возбудителя и строго под контролем ветеринарного врача.

Не допускается вывоз необеззараженного молока для продажи в учреждение общепита, и тем более в детские сады. Молоко от коров, реагирующих при исследовании на туберкулез, подлежит обеззараживанию путем переработки на масло-

сырец или кипячением. Молоко от нереагирующих коров неблагополучного стада подлежит обеззараживанию непосредственно в хозяйстве путем пастеризации при температуре 90° С в течение 5 мин. или при 85° С в течение 30 мин, при отсутствии пастеризатора-кипячению, после чего вывозят на молокозавод или используют внутри хозяйства. Доильные аппараты и молочную посуду ежедневно моют и дезинфицируют струей пара на флягопропаривателях или ванне в установленном порядке.

Использование пастбищ, на которых выпасались неблагополучные по туберкулёзу стада, разрешается в летнее время через 2-3 месяца в южных районах, в остальных через 4 месяца, а непроточных водоёмов - через 4 месяца после прекращения поения в них больных туберкулезом животных.

На территории хозяйств, в помещениях необходимо соблюдать чистоту и строго выполнять правила содержания и ухода за животными. Необходимо проведение профилактических, текущих, а перед снятием ограничений заключительных дезинфекций помещений, загонов, выгульных площадок, оборудования, инвентаря, а также дезинсекций и дератизаций в соответствии с действующей инструкцией.

***Крупный рогатый скот.*** Оздоровление неблагополучного по туберкулезу поголовья в зависимости от степени неблагополучия, проводят разными методами. При ограниченном распространении болезни (степень поражения менее 15% животных, от их общего количества в стаде, на ферме), оздоровление проводится методом систематических аллергических исследований и убоем больных животных на мясоперерабатывающем предприятии, с соблюдением ветеринарно-санитарных требований. Всех животных с 2-месячного возраста, через каждые 45-60 дней, исследуют двойной внутрикожной туберкулиновой пробой. Положительно реагирующих удаляют из стада. Реагирующих животных изолируют и в течение 15 дней сдают на убой как больных туберкулезом.

При получении по всему стаду двукратных отрицательных результатов, животных оставляют под контрольным наблюдением в течение 6 месяцев, и за этот период их исследуют дважды с интервалом 3 месяца. При отрицательных результатах, по проведению комплекса организационно-хозяйственных и ветеринарно-санитарных мероприятий хозяйство объявляют благополучным.



В случае выявления реагирующих при контрольных исследованиях, их подвергают диагностическому убою, и при обнаружении изменений свойственных туберкулезу, оздоровление стада осуществляют, как указана выше, методом удаления реагирующих. Если изменения свойственных туберкулезу отсутствуют, отбирают материал для бактериологического исследования (включая биопробу), а остальное поголовье исследуют аллергической пробой через 3 месяца. При отрицательных результатах аллергических и лабораторных исследований, стадо объявляют благополучным по туберкулезу. В случае получения положительных результатов бактериологических исследований (или биопробы), животных сдают на убой, а стадо продолжают оздоравливать, методом систематических исследований.

Молодняк, полученный от реагирующих на туберкулин коров, содержат изолированно, откармливают и сдают на убой.

Телок родившихся от нереагирующих коров оздоравливаемого стада, до его постановки на контрольное наблюдение после откорма сдают на убой.

Молодняк, полученный от коров в период контрольного наблюдения, содержат изолированно от взрослого скота, и при объявлении стада благополучным их выращивают в обычном порядке.

При установлении туберкулеза у крупного рогатого скота в благополучном районе, области, республике, впервые, оздоровление ферм осуществляют методом полной замены неблагополучного поголовья, здоровым скотом. Аналогичным образом поступают и при значительной распространенности болезни в стаде (более 15% больных животных). В хозяйствах прекращают аллергические исследования, осеменения коров и телок, молоко после пастеризации или кипячения, используют для выпойки телятам или отправляют на молокозавод.

Всех животных неблагополучного стада вместе с молодняком сдают на убой в течение 60 дней, причем в первую очередь откормочное поголовье, непродуктивных коров и молодняк. Поголовья животных, содержащихся на других фермах хозяйства, исследуют двукратной внутрикожной туберкулиновой пробой. Одновременно исследуют весь крупный рогатый скот в хозяйствах и населённых пунктах расположенных рядом с неблагополучным хозяйством.

После вывода неблагополучного поголовья, проводят дезинфекцию 3%-ным раствором формальдегида и каустической соды. Помещение и подлежащую территорию подвергают механической очистке полов, проходов, стен от навоза, кормов, демонтаж механического оборудования. Очищают от навоза и от остатков кормов территорию, выгульные площадки, снимают напольный грунт на 15-20 см. и вывозят за пределы фермы. Весь инвентарь непригодный для использования, сжигают. Навоз подвергают бактериологической обработке. В специально отведенном месте складируют в бурты шириной 3 м. и высотой 2м., закрывают землей и огораживают. Используют его через 2 года.

Решение по снятию ограничений принимается по результатам аллергических исследований животных данного хозяйства (включая собак и кошек), а также лабораторной проверки качества заключительной дезинфекции.

В случаях, когда в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах у реагирующих на ППД-туберкулин животных, туберкулез не подтверждается патологоанатомическим методом, а при лабораторном исследовании выделяются атипичные микобактерии или микобактериоподобные микроорганизмы, дальнейшее исследование проводят, симультанной туберкулиновой пробой с ППД-туберкулином и КАМ или ППД-туберкулином для птиц, и по интенсивности реакций определяют характер сенсибилизации. Из числа животных наиболее характерно реагирующих на ППД-туберкулин, проводят диагностический убой и лабораторные исследование – до получения 3-х кратных отрицательных результатов, после чего хозяйство объявляется благополучным по туберкулезу. Дальнейшее исследования и контроль за благополучием проводят как в благополучных по туберкулёзу хозяйствах

**Мероприятия в личных хозяйствах граждан.** При выявлении в отдельных хозяйствах граждан, фермеров, арендаторов реагирующих на туберкулин животных, проводят мероприятие по установлению туберкулеза. Выясняют источники и пути заражения животных, исследуют на туберкулез всех животных, находящихся на подворье, реагирующих сдают на убой.

Помещение очищают от навоза, остатков корма, деревянный пол вместе с грунтом снимают и с навозом складируют в бурт и огораживают. Вес мусор с прилегающей к

помещению территории сжигают. Проводят дезинфекцию, и после завершения ветеринарно-санитарных мероприятий снимают ограничения.

Если животные находились в стаде граждан населенного пункта, все поголовья исследуют на туберкулез и при отсутствии реагирующих и новых случаев заболевания стадо считают благополучным.

## **2. Собственные исследования**

### **2.1 Материалы и методы**

Работа выполнена ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный аграрный университет им. М.М.Джамбулатова», в животноводческих хозяйствах республики Дагестан с 2006 по 2015 гг.

Эпизоотические особенности туберкулёза крупного рогатого скота изучали в неблагополучных хозяйствах путём анализа ветеринарной отчётности, выяснения источников возбудителя инфекции и путей распространения.

Интенсивность эпизоотических показателей определяли по количеству неблагополучных пунктов, заболеваемости и инфицированности. Анализ собранной информации осуществляли согласно методическим указаниям по эпизоотологическому исследованию (Бакулов И.А. в соавт., 1982).

Аллергические исследования животных внутрикожной и симультанной пробами проводили по методикам предусмотренным «Наставлением по применению (ППД) туберкулинов для млекопитающих и для птиц (15.06.1995) и «Наставлением по проведению симультанной аллергической пробы с применением туберкулина и комплексного аллергена из атипичных микобактерий (КАМ) при диагностике туберкулеза животных» (1980) .

Для пальпебральной пробы использовали ППД – туберкулин для млекопитающих в дозе 0,2 см<sup>3</sup> (10000 МЕ). Учет и оценку реакций на туберкулин проводили через 48, часов после введения аллергена. Степень интенсивности реакции выражали в крестиках.

Внутривенную туберкулиновую пробу применяли с целью отбора животных для диагностического убоя, после проведения внутрикожной пробы. Предварительно термометрированным животным ППД- туберкулин для млекопитающих вводили в яремную вену, в дозе 1 мл 50%-ного раствора на 100 кг массы тела (обычно 4мл). Учет и оценку реакции проводили через 3,6 и 9 часов после инъекции, путем измерения температуры. Реагирующим считали животных с повышением температуры тела выше 39<sup>0</sup>С.

Всего исследовано животных: внутрикожной пробой - 36253, пальпебральной – 184, внутривенной - 128, симультанной с КАМ - 964 головы.

Лабораторным методам были исследованы 526 животных. Патологический материал высевали на питательные среды Сотона (синтетическая среда) ФИНН-2, Мюнца, Левенштейна – Йенсена (яичные среды) МПА, нитратный агар по Виноградскому, среду с парафиновой приманкой, модифицированная среда Бучина и др. по методикам предложенной, А.П. Аликаевой (1940) – для микобактерий, Songen N. (1913) в модификации R. Gordon, W. Hagan (1936) – для микобактериоподобных микроорганизмов в частности для нокардий и родококков.

Коринебактерии (эпизоотические а также тест штаммы) изучали по общепринятым методам (Изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов, 1966; Manual of Microbiological Methods, 1957; Abstract of Microbiological Methods, 1969).

Изолированные культуры микобактерий идентифицировали по ГОСТу 26072-84- «Методы лабораторной диагностики туберкулеза» (Ст. СЭВ 3457-81 от 9.01.1984) и ГОСТ 27318-87- «Методы идентификации атипичных микобактерий» (Ст. СЭВ 5627-86 от 2.06.1987 г.) нокардий и родококков - на основе биохимических свойств: по В. Becker (1964); F. Kanetsuna, A. Bartoli (1972); M. Lechewalier (1968); M. Goodfellow (1971); R.E. Gordon, (1953); R. Hugh и E. Lefson (1953).

В лабораторных условиях для заражения морских свинок и кроликов использовали известные тест-штаммы: M.bovis шт. 637, M.scrofulaceum, M.

БЦЖ, *M.flei*, *M.avium*, *M.tuberculosis*; нокардий – *N.asteroides* (ВКМ Ас 1077), *N.brasiliensis* (ВКМ Ас 867), *N.vaccinii* (ВКМ Ас 856); родококками – *R.amarae* (ВКМ Ас 801), *R. equi* (ИМВ Ас 740), *R.rhodochrous* (ИМВ Ас 744), *R.ruber* (ИМВ Ас 745), *R.luteus* (ИМВ Ас 385), *R.maris* (ИМВ Ас 195), *R.bronchialis* (ИМВ Ас 737), коринебактерий – *C.unternice nontoxigen* №25., 7227., *C.xerosis* №1911, *C.nontoxigen*.

Культуры нокардий и родококков получили из ИМБ им. Д.К. Заболотного АН Украины, а коринебактерий - НПО «Питательные среды» города Махачкала.

Для получения опытных образцов коринебактерий (*Corynebacterium xerosis* N1911), выращивали на синтетической среде Сотона с добавлением смеси индивидуальных n- алканов, содержанием в цепи от 10 до 17 атомов углерода, в течение 2-х месяцев. Следует, отметить, что среда Сотона нами была модифицировано и сравнительно испытано ранее. Результаты этих испытаний показали большую эффективность модифицированного варианта для выращивания коринебактерий, биомасса которых превышало контрольные серии более 2-х раз. Это позволило получить 2-раза больше активного белка к единицы объема. Колбы с культурой, где толщина слоя бакмассы достигал около 1см, автоклавировали при 1,5 атм. в течение 30 мин. Отделяли бактериальную массу фильтрацией и центрифугированием, после чего проводили осаждение белка. Из объёма супернатанта в количестве 1,5 литров осаждением в изоэлектрической точке NaCl (18% -концентраций, при 4,1 РН) получили 3,2 гр. белка. Осадок промыли, высушили, расфасовали в стеклянные флаконы и хранили, в холодильнике. Испытуемые концентрации белка (0,00005; 0,0001; 0,0002; 0,0003; 0,0004 и 0,0005 мг в 0,1 мл), получили, разбавив 0,01мл (0,001гр) раствора 10% концентраций, в стерильном физиологическом растворе (1: 1000). После перемешивания, по 0,1 мл раствора внесли поочерёдно в пробирки с физиологическим раствором (9,9; 4,9; 2,9; 2,4; 1,9 и 19,9 мл), получив, таким образом, разведение, 1:100, 1:50, 1:30, 1:25, 1:20, и 1:200 соответственно.

Пороговую чувствительность аллергена определяли на 28 морских свинках, через 25 дней после подкожного заражения коринебактериями, в дозе 10 мг влажной культуры в 1 мл физиологического раствора. Каждую титруемую дозу аллергена в 0,1 мл раствора вводили внутрикожно, на депилированный участок боковой ребёрной поверхности. Реакцию оценивали через 32 часа после введения. Интенсивность реакций (в мм<sup>2</sup>), определяли по диаметру папулы, вычисляли площадь, усреднённую величину интенсивности реакций, на определённую концентрацию белка.

Сенсибилизирующие свойства коринебактерий к туберкулину изучали на зараженных (БЦЖ, *Mycobacterium avium*, *Corinebacterium xerosis* N1911, *C. ulcerans* N675, *C. bovis*) морских свинках через 30,60 и 90 дней. Исследование проводили на 36 морских свинках, каждой культурой заражали по 6 морских свинок, подкожно, в области лопатки с левой стороны, введением 10мг влажной культуры в 1 мл физиологического раствора. ППД-туберкулин для млекопитающих вводили внутримышечно в дозе 25 мг в объеме 0,1 мл

Аллерген из *Corynebacterium xerosis* N1911, *M.scrofulaceum* №12-С и *M.intracellulare* №13-Н, готовили исходя из содержания белка в КАМ-е - 1350 единиц действия в 0,2 мл. раствора и 0,0003мг белка коринебактерий в 0,1 мл, которая была нами принята за единицу. Для этого брали 20,25 мг влажной культуры *Corynebacterium xerosis* и смешивали с 10 мл КАМ-а. Для получения рабочего раствора, содержанием 15 единиц действия в 0,1 мл, на морскую свинку, 0,2мл (1350ед), растворили в 8,8 мл физраствора (1:45).

Испытание аллергена проводили на зараженных микобактериями (*scrofulaceum* и БЦЖ) и коринебактериями (*xerosis*) морских свинках в количестве 28 голов.

Для получения аллергенов культуру *N.asteroides* и *R.bronchialis* выращивали в течение двух месяцев на усовершенствованной нами синтетической среде Сотона, белок получали путем осаждением в изоэлектрической точке натрия хлорид, каторую далее растворяли в

дистиллированной воде. Определения белка проводили по методу (Лоури), концентрацию по аналогии с туберкулином. Определяли чистоту и безвредность по установленным общепринятым методам.

Активность аллергенов изучали в лабораторных условиях, на зараженных нокардиями и родококками кроликах -32 и морских свинках-70, также в практических условиях на здоровых, больных и на реагирующих, на туберкулин животных.

Способность сенсibilизировать организм животных нокардиями и родококками определяли на опытных кроликах в динамике. Учитывали реакцию через 24-48 часов, последующем через каждые 30 дней. Продолжительность опыта составляла 90 дней. Положительно реагирующим считали кроликов уселичением кожной складки на месте введения аллергена 50 мм<sup>2</sup> и более.

Комплексный аллерген из микобактериоподобных микроорганизмов (*M. scrofulaceum* №12-С, *M. intracellulare* №13-Н, *Corinebacterium xerosis* N1911, *N. asteroides* (ВКМ Ас 1077), *R. bronchialis* (ИМВ Ас 737), готовили исходя из содержания белка в комплексном антигене (КАМ) - 1350 единиц действия каждого из составляющих компонентов в 0,2 мл. раствора и 0,0003 мг белка коринебактерий, которая была нами принята за единицу. Для этого, 20,25 мг влажной культуры *Corynebacterium xerosis* смешали с 10 мл. комплексного аллергена, получив таким образом 10 мл аллергена состоящего из белков атипичных микобактерий, нокардии, родококков и коринебактерий. Для приготовления рабочего раствора, содержанием 15 единиц действия в 0,1 мл. на морскую свинку, 0,2 мл (1350 ед), растворили в 8,8 мл физраствора (1:45).

Испытание полученного аллергена проводили на 30 заражённых микобактериями (*scrofulaceum*, БЦЖ), коринебактериями (*xerosis*), нокардиями (*asteroidis*) и родококками (*bronchialis*) морских свинках, через 27 дней после заражения.

Производственное испытание проводили в хозяйстве на 136 животных (коровы и нетели разного возраста).

Изучение разных доз аллергенов для аллергической диагностики коринебактериоза проводили на 25 морских свинках сенсibilизированных коринебактериями (*Corinebacterium xerosis* N1911). Испытание аллергена на специфичность проводили на зараженных коринебактериями и атипичными микобактериями морских свинках в количестве -30 голов и на зараженных туберкулезом животных – 6 голов.

Липид LCN – А, по наличию которой коринебактерии отличаются от микобактерии, определяли в этанол-эфирных экстрактах с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), состоящий из трех последовательных этапов: 1.получения бакмассы, 2.подготовка, 3.тонкослойная хроматография на силикагеле.

Суть метода в следующем: Бактериальную массу, выращенную на среде Сотона, промывали дважды в дистиллированной воде (при 5000 об/мин), высушивали при 37°C в течение суток, отобрали 400 мг бактериальной массы и измельчили в ступке, далее, залили 4 см<sup>3</sup>. смеси 96° этилового спирта и серного эфира (соотношение 1:1). Периодически пробирки встряхивали в течение суток, при этом дважды меняли экстракционную смесь, затем фильтровали, через бумажный фильтр, потом экстракты высушили при 34°C. в течение суток, разбавили бензолом из расчета 0,3 см<sup>3</sup> на 400 мг исходной бактериальной массы, после чего на точку «старта» на расстоянии 1,5 см нанесли 0,01 см<sup>3</sup>. раствора. Прежде на пластинке отметили фронт подъема растворителя (13,5см). В процессе ожидания пластинку дважды вынимали, переворачивали и высушивали в вытяжном шкафу в течение 20 мин. После двух кратной обработки пластинку погрузили в растворитель на глубину не более 0,5 см. Для разделения пятен липидов использовали систему, состоящую из гексана, эфира (по 50 см<sup>3</sup>) и ледяной уксусной кислоты (2 см<sup>3</sup>), которых выявляли обработкой пластинки 10% спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты. В случае не обнаружение пятен пластинку помещали в сосуд с метанолом, затем высушивали при комнатной температуре в течение 2-3 минут и опрыскивали фосфорно-молибденовой



кислотой, для проявления ставили в сушильный шкаф при температуре 105°C в течение 10-12 минут.

Довольно стабильный дифференцирующий коринебактерий от ноккардий и родококков метод анаэробного усвоения глюкозы с использованием нейтральной (рН = 7,0) среды, состоящей из компонентов: пептона – 5,5, дрожжевого экстракта – 0,5, глюкозы, бромкрезолпурпура – 0,02, агара – 1,2 и воды дистиллированной – 500 см<sup>3</sup>, проводили следующим образом. В начале стерилизовали пробирки со средой (2/3 части) при 125°C в течение 20 мин. Среду пропаривали перед посевом 10-15 мин и ставили в холодную воду для затвердения. Производили посев погружением петли с исследуемой культурой до дна пробирки, после чего заливали стерильным парафином (толщина слоя 25 мм) затем инкубировали при 37°C в течение 5 дней. В случае образования кислоты цвет индикатора менялся, малиновый в желтый. Коринебактерии в процессе роста в анаэробных условиях образуют кислоту.

Характерный для коринебактерий признак, дифференцирующий его от неспорообразующих, грамположительных, анаэробных палочек неправильной формы - фермент каталаза, определяли нанесением капли перекиси водорода (3%-ный раствор) на предметное стекло с исследуемой культурой. Образование пузырьков газа – свидетельство присутствие каталазы.

Оценку иммунологического статуса лабораторных животных проводили на 36 морских свинках с помощью реакции; розеткообразования (РОК), бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ), специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ) торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ).

Реакция бласттрансформации проводили по описанию Э.Н.Шляхова (1977). Исследуемую кровь в количестве 10 мл разливали в пробирки с гепарином(25 ЕД/мл) и ставили в термостат при 37°C на 60 мин, для осаждения эритроцитов. Надосадочный слой плазмы отсасывали и определяли число лейкоцитов в 1 мл, после разводили с питательной средой 199 с антибиотиками, в концентрации 10<sup>6</sup> клеток в 1 мл. Взвесь по 2 мл, разлили стерильно во

флакончики с 0,2 мл ППД – туберкулина, плотно закрыли и поставили в термостат при температуре 37<sup>0</sup>С на 2 – 7 суток вместе с контролями (смесь без аллергена-антигена). В указанные сроки из культуры делали мазки, окрашивали по Романовскому – Гимза и подсчитывали мононуклеары. Процент трансформированных клеток (бластов), определяли из 1000 посчитанных клеток. Клетки, подвергшиеся бласттрансформации, увеличивались в размерах до 20-40 мкм в диаметре, имели рыхлое ядро, занимающее большую часть клетки и зернистую базофильную цитоплазму. Реакцию оценивали как положительную, если число активированных клеток составляло не менее 4% от общего числа культивируемых клеток. В контроле процент трансформации не превышало 4.

Суспензию эритроцитов (5%) для реакции розеткообразования тонизировали в растворе Хенкса в термостате при 37<sup>0</sup>С. Отмытую суспензию разлили в пробирки, добавили ППД-туберкулин в соотношении 1:1. Взвесь инкубировали при 37<sup>0</sup>С в течение 30 минут, отмыли и добавили свежеприготовленную плазму исследуемых животных в соотношении 1:1, и инкубировали в термостате при 37<sup>0</sup>С в течение 45 минут, затем поставили в холодильник при + 4<sup>0</sup>С на 18 часов. После готовили мазки, окрашивали по Романовскому – Гимза и подсчитывали под иммерсионной системой микроскопа. За розеткообразующую клетку (РОК) принимали лимфоцит, к которому присоединилось 3 и более эритроцитов.

Симультанную пробу исследуемых аллергенов и ППД туберкулина, ставили в политесте, на 28 морских свинок и КРС в количестве 190 голов, введением туберкулина (справа) и аллергена (слева) в дозе 0,2 см<sup>3</sup>. Через 72 часа после введения проводили учёт и оценку реакции.

При учете реакции у каждого исследуемого лабораторного животного пальпировали место введения аллергенов, при обнаружении изменений в коже на введение хотя бы одного алергена, измеряли кутиметром, толщину кожной складки в миллиметрах и определяли ее утолщение сравнением с толщиной неизмененной складки кожи. Выраженную реакцию на туберкулин при менее выраженной или полностью отсутствующей на изучаемый

сенситин обозначали знаком «+», менее выраженную реакцию на туберкулин знаком «-», одинаковым - знаком «=». Нереагирующих на туберкулин животных, независимо от наличия реакции на изучаемый сенситин не учитывали. Результаты оценки реакций вносили в ведомость учета, и по таблице, определения различия реакций на туберкулин и КАМ, определяли различия в интенсивности реакции на изучаемые аллергены.

При обработке цифрового материала использовали метод вариационной статистики в зависимости от поставленной цели (Лаким Г.Ф., 1980). с использованием программ «Б-01», «Корреляция», методы определения «критерий знаков» и определения достоверности разницы между средними выборками (зависимыми и независимыми).

Экономический эффект определяли согласно инструкции, утверждённой Департамент ветеринарии МСХ и продовольствия РФ от 21 февраля 1997 года. Некоторые методики исследования изложены в соответствующих разделах.

## **2.2. Особенности проявления туберкулеза крупного рогатого скота в Республике Дагестан**

Анализ эпизоотической ситуации по туберкулезу на основе статистических данных Комитета по ветеринарии, Прикаспийского ЗНИВИ, а также собственных исследований, показал, что за 55 лет (1960-2015) эпизоотический процесс по туберкулезу КРС в Дагестане можно подразделить на 4 периода.

Первый период охватил 1960-1975 гг. с наибольшим числом неблагополучных пунктов в 1964 году. Происходившие изменения были вызваны теми же причинами, что и во многих других неблагополучных регионах России. Широкомасштабные мероприятия развернутые с туберкулезом в 60-х годах, чему способствовала укрепления материально-технической базы хозяйств и улучшение ветеринарного обслуживания, позволили повсеместно уточнить эпизоотический статус хозяйств.

Одновременно снижался уровень передержки больного скота. Такая организация работы обеспечила стабилизацию эпизоотической ситуации, а с 1968 года начался процесс ее постепенного улучшения. К началу 70-х годов республика официально считалась благополучной по туберкулезу. Однако, благополучие хозяйств оказалось условным, поскольку первые же контрольные комиссионные исследования, проведенные в 1976 году в 2 – хозяйствах Буйнакского и Лакского районов показали высокую степень пораженности скота туберкулезом.

Второй период (1978-1993) характеризуется дальнейшим распространением туберкулёза во всех почвенно-климатических зонах республики. Как видно из данных таблицы 3 и рис. 1, туберкулёз крупного рогатого скота был зарегистрирован в 96 хозяйствах 28 районов. Наибольшее распространение было в хозяйствах, находившихся на административной территории Бабаюртовского, Карабудахкентского (плоскостная зона), Буйнакского, Хасавюртовского (предгорная зона), Курахского, Лакского, С. Стальского и Цунтинского районов (горная зона).

## Показатели заболеваемости туберкулёзом крупного рогатого скота по районам

Таблица 3

Название района	Показатель заболеваемости туберкулезом к.р.с. (на 10 тыс. гол.) по годам																												
	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	98	99	2000	2001	2002	3	4	5	2006	2007	2008	2009	2010	2011	12	13	14	15
Агульский	2,7	1,7					16,7	21,4	3,8	4,6	2,2	1,2											1,7						
Акушинский				2,3	0,2																								
Ахвахский		0,7		0,1																									
Ахтынский	2,1						6,4																						
Бабаюртовский		4,6	3,4	2,5	2,7	12,3		11,6	6,1		1,9		2,3			1,8					4,5	3,6		3,2			1,4	2,8	2,4
Боглихский				0,3			7,2																						
Буйнакский	3,4	2,2	2,9	2,1	1,6	10,6	9,6	6,3	1,1	2,3	1,6	2,3										2,3	1,9	0,6	2,7	2,1	1,2	0,6	
Гергебильский																													
Гумбетовский	0,7	0,2	1,1											1,6															
Гунибский					0,8	8,9							1,2										1,7	1,1					
Дербентский	1,2		0,7	0,7																									
Дахадаевский						6,4																							
Казбековский	1,6	0,7	0,2																										
Кайтагский																													
Каякентский				1,2																									
Кулинский	0,9		0,4				2,3				2,2					1,1						1,3	0,8						
Курахский		3,8				9,4				1,4	1,3																		
Карабудахкен.	3,7	3,2	3,1	2,4	1,9	7,3	19,4	10,5		2,6				1,8							6,7			2,4	1,4	1,1			
Лакский					1,1																						3,0	0,8	
Левашинский	1,1		0,5				2,2																1,4	0,8	0,5				
Магарамкентс.																													
Новалакский	0,1		1,1			6,4			3,6	2,2			1,8	1,3								1,8							
Ногайский																													
Ругульский	0,8				0,7																								
Шамильский																													
Сергокалинс.		1,3	0,3					3,3						2,3															
С. Стальский																													
Табасаранский																													
Тарумовский	2,2	1,1	0,9	0,3	0,7																		1,3				0,7	0,2	
Тляротинский																													
Унцукульский		2,1																											
Хасовюртовск.	2,8	3,4	2,2	2,7	2,1	8,5	10,9	6,7	2,4													2,1	1,2	0,9	0,4	0,2			3,3
Кизларский	0,3					3,4																							1,7
Кизилортовс.	2,7	2,8	1,8	2,9	3,4	9,6	7,8	3,8	1,11,9	2,7	3,6			2,7							1,9		2,2	1,8	1,2	0,9			
Хивский																													
Хунзахский				1,1																			1,8						
Догузпаринск.																													
Кумторкалинс.			1,1			6,8				1,1																	1,8		
Цумадинский																													
Цунтинский			0,7																										
Чародинский																													
<b>Всего</b>	<b>25,8</b>	<b>27,8</b>	<b>19,7</b>	<b>18,6</b>	<b>15,2</b>	<b>89,6</b>	<b>85,2</b>	<b>65,9</b>	<b>18,1</b>	<b>16,1</b>	<b>11,9</b>	<b>7,1</b>	<b>5,3</b>	<b>3,9</b>	<b>5,8</b>	<b>2,9</b>					<b>12,4</b>	<b>11,1</b>	<b>14,0</b>	<b>10,8</b>	<b>6,2</b>	<b>7,3</b>	<b>5,9</b>	<b>5,3</b>	<b>5,7</b>

### Годовые показатели туберкулеза крупного рогатого скота в Республике Дагестан (1987-2015гг)

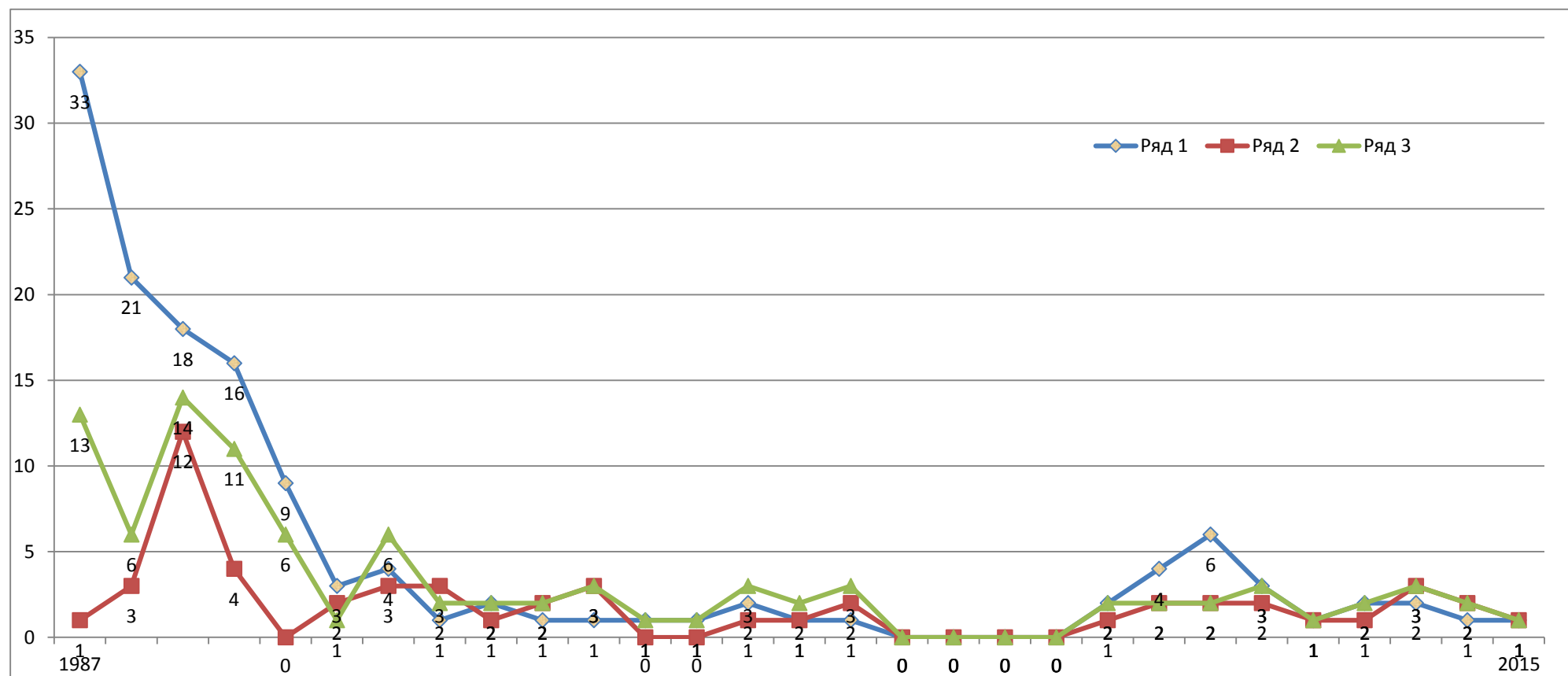


Рисунок 1

- Ряд 1 - наличие неблагополучных пунктов на начало года
- Ряд 2 - выявлено неблагополучных пунктов в течение года
- Ряд 3 - оздоровлено неблагополучных пунктов

Наибольшее распространение болезнь получила в хозяйствах Бабаюртовского, Ленинского, Хасавюртовского, Кизилюртовского, Буйнакского, С. Стальского районов, в прикутанных хозяйствах Гумбетовского, Цунтинского, Хунзахского районов. При первых же исследованиях крупного рогатого скота в хозяйствах Ленинского района было установлено, что болезнь имеет широкое распространение. Из 15 хозяйств 8 оказались неблагополучными. Практически все фермы принадлежащие колхозам «Путь Коммунизму» и «Заря» были признаны неблагополучными по туберкулезу. Неблагополучными также оказались 12 из 17 хозяйств Бабаюртовского района. Помимо этого, болезнь зарегистрирована в 28 хозяйствах принадлежащих горным районам, расположенных в этом районе. При анализе причин распространения болезни выявлено: низкий уровень санитарной культуры на животноводческих объектах, ввод в стада не исследованного скота без карантинирования, использования в корм животным сборных молочных продуктов, запоздалая диагностика, также передержка больного туберкулезом скота.

В итоге все это привело к возникновению крупных очагов туберкулёза: неблагополучных пунктов – 73, заболевших 18,7% и инфицированных – 55,9%.

Немаловажное значение в распространение туберкулеза имело место и перегруппировка скота без учета эпизоотологических данных хозяйств поставщиков, например колхоз "Коммунизм" Бабаюртовского района который до 1981 года числился благополучным хозяйством-поставщиком ремонтных телок. В течение 8 лет с 1981-1989 гг. хозяйство реализовало племенных телок благополучным по туберкулезу колхозам "XXII партийного съезда" Карабудахкентского района, им. Мичурина Акушинского, совхозу "Андикий" Ботлихского, "Оборона страны" Дербентского, "Калининский" С. Стальского районов и Чародинский МХП,

где при контрольных исследованиях в последующем был установлен туберкулез.

В Хасавюртовском районе в колхозе им. Горького при исследовании в период карантинирования 16 тёлочек молочного направления, завезенных из этого же колхоза 9 (56,25%), реагировало на туберкулин. При патологоанатомическом вскрытии у 6 животных были обнаружены изменения туберкулезного характера в подчелюстных и бронхиальных лимфатических узлах. В дальнейшем контрольно-комиссионными исследованиями животных в количестве 1679 голов, принадлежащих данному колхозу, выявлено 456 (27,15%) реагирующих на туберкулин животных, в том числе коров 98 (44,54%) из 220 исследованных.

Сравнительно тяжёлое положение сложилось в хозяйствах Карабудахкентского района, где не осталось ни одного благополучного по туберкулёзу стада. Во многих хозяйствах района вывлено и сдано на убой 61402 животных больного туберкулёзом. Практически все животные в комплексах промышленного типа Республики оказались поражёнными туберкулёзом. Причем в большинстве из них, например, в колхозе им. Горького Хасавюртовского, молочно-товарные комплексы Карабудахкентского, колхоз «Оборона страны» Дербентского районов, заболеваемость животных доходило до 96 %, поэтому приходилось оздоравливать стада по принципу «все занято, все пусто».

Высокая поражённость скота туберкулёзом, которая в некоторых хозяйствах доходила до 95%, например Карабудахкентском районе, от 50,2 до 97, Хасавюртовском – от 4,3 до 13,2, Бабаюртовском – от 8,9 до 16,1, Гумбетовском – от 4,4 до 24% и т.д., свидетельствовало о длительном неблагополучии этих хозяйств.



К тому же, в хозяйствах с/з “Кучхюрский” Курахского, к/з им. Габиева Лакского, к/з им. Ю. Акаева Буйнакского, с/з “Доргели” и с/з “Рассвет” Карабудахкентского районов, были отмечены случаи повторного заболевания туберкулёзом, как результат не качественного проведения ветеринарно-санитарных и организационно-хозяйственных мероприятий.

На нескольких фермах (с/з “Россия” Карабудахкентского, им. Горького Хасавюртовского, к/з “Оборона страны” Дербентского районов) заболеваемость доходило до 97-100%.

В течение 20 лет (1978-1998) в хозяйствах находящихся во всех почвенно-климатических зонах республики исследовано 12088973 голов, выявлено 170577 больных туберкулёзом животных (1,4%). Исследования, проведенные нами, показывают, что туберкулез занимает лидирующее место в инфекционной патологии крупного рогатого скота в республике (таблица 4).

Таблица 4

Удельный вес туберкулёза крупного рогатого скота в  
инфекционной патологии (2000-2015 гг.)

№ пп	Наименование болезни	неблагопо лучные пункты	заболело	удельный вес в %	
				неблагоп. пунктов	заболевшие
1	Бруцеллез	403	27956	32,2	72,0
2	Туберкулез	105	6739	8,4	17,3
3	Трихофития	102	416	8,1	1,0
4	Лептоспироз	97	516	7,7	1,3
5	Лейкоз	94	143	7,5	0,3
6	Пастереллез	85	1260	6,8	3,2

7	Колибактериоз	78	216	6,2	0,5
8	Сальмонеллез	64	167	5,1	0,4
9	Злокачественный отек	56	54	4,4	0,1
10	Эмфизематоз. карбункул	48	274	3,8	0,7
11	Актиномикоз	34	367	2,7	0,9
12	Бешенство	28	288	2,2	0,7
13	Хломидиоз	23	35	1,8	0,09
14	Некробактериоз	12	275	0,9	0,7
15	Паратуберкулез	8	44	0,6	0,11
16	Сибирская язва	7	34	0,5	0,08
17	Диплококк. инфекция	6	27	0,4	0,06
	Всего	1250	38811	100,0	100,0

По приведенным данным в таблицы 2, из общего количества болезней, туберкулёз занимает второе место. В период с 2000 по 2015 гг. выявлено 8,4% неблагополучных пунктов и 17,3% заболевших животных. За этот период сдано на убой 25007 голов, более 70% из которых составляли коровы.

Третий период (1994-2006 гг.) характеризуется изменениями условий хозяйствования, которые закономерно привели к изменению эпизоотической ситуации. Так, с 1994 по 2001 год, лишь в отдельных хозяйствах (совхозе «Уллосовский» Буйнакского, колхозе им К.Маркса, Хунзахского, совхозе «Адагинский» Кайтагского, колхозе «Тельмана» Гумбетовского, «1 Мая» Чародинского, совхозе «Казбекова» Кулинского (Кизилюртовская зона отгонного животноводства), совхозе «Карабудагово» Карабудахкентского, колхозе «М.Горького» Хасавюртовского, в совхозе «Приморский» Дахадаевского районов (Бабаюртовская зона отгонного животноводства)

зарегистрировано по 1 неблагополучному пункту. В совхозе «Султангиюртовский» Кизилюртовского района – 2 н/п. Всего за 9 лет зарегистрировано 11 неблагополучных пунктов, где заболеваемость доходило до 0,04%.

С 2002 по 2005 год туберкулез в республике не регистрируется. (таблица 5). Значительное «улучшение» эпизоотической ситуации по туберкулезу в указанный период, на наш взгляд, связано с;

- уменьшением численности поголовья КРС в республике, с 1476300 голов (1989) до 674000 (2002) т.е. сократилось более чем в 2 раза.

- ликвидацией и разукрупнением комплексов промышленного типа, созданием мелких, подсобных, фермерских хозяйств и увеличением более чем на 96%, поголовья в частных подворьях.

- несовершенствованием ветеринарного учета, отсутствием регистрации неблагополучных очагов в индивидуальных хозяйствах.

Вместе с тем, следует отметить, что многие бывшие неблагополучные пункты «ликвидировались» вместе с расформированием колхозов и совхозов и подворовым разделом их собственности, в том числе и большого туберкулезом скота.

Таблица 5

## Показатели эпизоотического процесса туберкулеза КРС в РД в 1987-2015 гг.

Показатели	Количество по годам																												
	1987	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	2000	1	2002	3	4	5	6	2007	2008	2009	2010	2011	12	13	14	15
Наличие н/п на 0.01.	33	21	18	16	9	3	4	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	-	-	-	-	1	3	5	4	4	2	2	1
Выявлено новых н/п в течении года	1	3	12	4	-	2	3	3	1	2	3	-	2	1	1	2	-	-	-	-	3	4	6	2	1	1	3	2	1
Оздоровлено н/п	13	6	14	11	6	1	6	2	2	2	3	-	1	2	1	2	-	-	-	-	2	2	4	3	1	3	3	3	1
Осталось на передержке больного скота	1647	353	621	154	-	-	1	2	1	1	1	-	-	7	5	10	-	-	-	-	1	4	6	11	4	5	6	3	4
Заболело в течение года	1405	1178	787	791	685	434	310	381	261	227	222	31	31	15	8	21	-	-	-	-	3	17	6	9	5	4	4	2	2
Заболеваемость на 100 тыс.	258	278	197	186	152	896	852	659	181	161	119	71	53	39	58	29	-	-	-	-	124	111	140	108	62	73	59	53	57
Очаговость	90	64	47	47	49	102	98,1	65,2	108	55,5	6,2	2,0	2,0	4	6	2	-	-	-	-	3,8	2,9	7,6	15,3	5,8	4,8	9,6	2,3	-

Таким образом, происходило расщепление крупных хозяйств на мелкие, в том числе и очагов инфекций.

Деструктивные изменения произошедшие в стране дестабилизировали и без того сложную эпизоотологическую и эпидемиологическую ситуацию. Снижение материальной обеспеченности хозяйств, привело к ухудшению условий содержания и кормления животных, затруднению в проведении ветеринарно-санитарных мероприятий. Низкий уровень диагностических и профилактических мероприятий, безответственное отношение ветеринарных специалистов к данной проблеме, отсутствие целенаправленной совместной с медицинскими работниками программы по борьбе с туберкулезом, утвержденные правительством республики, привело к ухудшению и эпидемиологической ситуации в стране. Увеличилось число больных людей с впервые выявленным туберкулезом. В 2002 году, выявлено 1306 больных, на учете находилось 7509 человек. В 2014 году 1625 и 6692 соответственно.

Четвертый период (2007-2015 гг.) связан с относительной стабилизацией общей ситуации в стране в целом. Проведенные контрольно-комиссионные исследования в 2007 году, в КФХ «Чантаул» Буйнакского и на прикутаных хозяйствах Лакского районов (колхоз им «С. Габиева», СПК «Вицхинский») показали высокую степень зараженности скота туберкулезом. Впоследствии туберкулез был выявлен в фермерских хозяйствах «Розеда» Кизилюртовского, «Сулак» Бабаюртовского, «Калина» Хасавюртовского, КФХ «Дагестан» Буйнакского, и «Аракул» Акушинского районов (Бабаюртовская зона отгонного животноводства). Выявлен также туберкулез в индивидуальном хозяйстве «Аграхан» Кизилюртовского района, с высокой очаговостью, что указывает на слабое проведение контрольных и профилактических мероприятий. К сожалению, у самого руководителя данного хозяйства впоследствии был выявлен туберкулез в запущенной форме. В 2008 году в СПК «Знатные люди» Хунзахского района (Бабаюртовская зона) при диагностических исследованиях

обнаружено 94% реагирующих на ППД-туберкулин животных. Патологоанатомическим осмотром выявлен генерализованный туберкулез, что указывала на запоздалую диагностику. Частота обнаружения туберкулеза в запущенной форме, свидетельствовало о давности туберкулезного процесса во многих хозяйствах республики.

Паражение животных с высокой очаговостью (16%) в фермерском хозяйстве « Лаказан» Лакского района (Бабаюртовская зона) оказалось следствием бесконтрольного перемещения животных. Руководитель, без учета эпизоотического статуса, приобрел 3 телок из неблагополучного хозяйства в Кизилюртовском районе, и поместил в общее стадо, где впоследствии был обнаружен туберкулез.

Причины неблагополучия животных по туберкулезу практически во всех хозяйствах были связаны с нарушением ветеринарно-санитарных и организационно - хозяйственных мероприятий. В благополучные стада помещали животных неизвестного происхождения без карантинирования, диагностическими исследованиями охватывали не все поголовье, особенно в населенных пунктах (частное подворье). Немаловажное значение имели условия содержания и кормления животных. Несбалансированный по микро - макроэлементам и витаминам рацион, приводил к снижению иммунобиологического статуса животных, где туберкулез как факторная инфекция имела все условия для распространения.

Среди причин стационарного неблагополучия хозяйств по туберкулезу в республике следует назвать длительную передержку животных и запоздалую диагностику, на что указывает частое обнаружение генерализованных форм во внутренних органах и выявление больных нетелей, телок и телят (таблица 6)

Динамика эпизоотии туберкулеза показывает, что начиная с 2007 года, происходило увеличение числа неблагополучных пунктов, что связано с началом широкомасштабных комиссионных исследований скота (таблица 7).

С 2007 по 2015 гг. туберкулез был установлен в 23 хозяйствах, из которых 22 оздоровлены, и отмечена вертикальная зональность. Так, из 142 неблагополучных пунктов на плоскостную зону приходится – 86, предгорную – 38 и горную – 18. В тоже время 28 пунктов из 86, 6 из 38 и 12 из 18 приходится на хозяйства горной зоны расположенных на отгонных пастбищах.

Незначительное распространение, заболевание имело место на территориях Агульского, Дербентского, Кизлярского, Кулинского, Тарумовского, Хивского, Дахадаевского, Кайтагского, Каякентского, Лакского и Новолакского районах (от 3 до 6) неблагополучных пунктов. Свободными от туберкулеза были хозяйства, расположенные в южной и юго-западной части Прикаспийской низменности (Сулейман-Стальский, Рутульский, Чародинский, Цумадинский, Шамильский, Ахвахский, Гергебильский районы, Бежтинский участок и др.) а Северный Дагестан (Ногайский район) практически оказался благополучным.

Сравнительный картографический анализ см. карту-схему, распространённости туберкулеза в Республике показывает, что по степени напряжённости эпизоотической ситуации, территорию можно подразделить на четыре зоны:

- Зона сильного распространения (плоскостная) - более 130 неблагополучных пунктов;
- Зона значительного распространения (предгорная) – от 5 до 32 неблагополучных пунктов;
- Зона незначительного распространения (горная) – от 2 до 6 неблагополучного пункта.
- Зона свободная от туберкулеза, (22 района), занимающее южную, юго – западную горную зону и территорию Нагайского района.

Благополучие Ногайского района объясняется тем, что здесь размещены специализированные овцеводческие хозяйства, а КРС не более 9 тыс. и то принадлежит частному сектору.

Как видно из данной схемы наибольшее число неблагополучных хозяйств (41,9%) выявлено на территориях Бабаюртовского, Хасавюртовского, Кизилюртовского и Карабудахкентского районов, занимающих центральное положение между северным и южным Дагестаном. Особенно широкое распространение туберкулез имеет в Бабаюртовской зоне отгонного животноводства (более 30 хозяйств), значительное – в Курахском и С.Стальском (предгорье) и спородическое - в Хивском, Агульском, Кулинском, Дербентском, Кайтагском, Дахадаевском, Каякентском (горная зона), а также в Тарумовском, Кизлярском (Северный Дагестан) и Буйнакском (центральный предгорный Дагестан) районах. Основной массив горного Дагестана (юг и юго-запад) и Ногайский район (северный Дагестан) являются «чистыми» по туберкулезу крупного рогатого скота, что связано с развитым овцеводством и отсутствием крупных животноводческих комплексов.



Таблица 6

## Факторы, способствующие распространению туберкулёза КРС в республике Дагестан

Район	Хозяйство	Год	Всего голов	Заболело	Подтверждён диагноз		Предполагаемые источники и факторы передачи инфекции
					Аллергические	Бактериологич.	
Бабаюртовский	с-з «К. Лабкнехта»	1986	1740	830	+	+	Комплектация стад из неблагополучных хозяйств, анергичные животные, инфицированное молоко и обрат, отсутствие изоляторов для больных.
	с-з «Кировский»	1987	3960	1459	+	-	
	с-з «Татаюртовский»	1988	1800	584	+	+	
	с-з «Хаммамаюрт-й»	1989	1965	598	+	+	
	с-з «Коммунизм»	1990	780	70	+	+	
	с-з «Тельмана»	1991	1136	56	+	-	
	с-з «Энгельский»	1993	960	12	+	+	
	спк «Рассвет»	1994	216	8	+	+	
	ф/х «Калина»	1996	115	14	+	+	
	п/х «Сулак»	1998	37	2	-	+	
	ф/х «Розеда»	2001	174	8	+	+	
	к-х «Равнина»	2006	316	6	+	+	
	кфх «Кумбатор»	2007	420	7	+	+	
	с-з «Кировский»	2009	2978	16	+	+	
	с-з «Татаюртовский»	2012	716	12	+	+	
	спк «Магриб»	2013	270	5	+	+	
с-з «Тельмана»	2014	415	6	+	+		
спк «Львов»	2015	316	4	+	-		
Буйнакский	с-з «Аксаева»	1986	684	32	+	-	
	с-з «Бугленский»	1987	987	130	+	-	

	с-з «Чапаева»	1988	1350	497	+	+	Приобретение животных из неблагополучных хозяйств, длительная передержка больных в хозяйстве, тесные межхозяйственные связи.
	с-з « Уллусовский»	1989	1170	300	+	+	
	кфх « Чантаул»	1990	378	26	+	+	
	спк « Буйнакск»	1991	678	18	+	+	
	ф/х « Перевал»	1992	534	7	+	+	
	с-з « Аксаева»	1993	205	12	+	+	
	п/х «Калибри»	1994	86	3	+	+	
	с-з « Чапаева»	1995	489	16	+	+	
	спк «Унцукул»	1996	356	8	-	+	
	кфх « Горец»	1997	298	11	+	+	
	с-з « Бугленский»	2007	275	14	+	+	
	с-з « Уллусовский»	2008	615	16	+	+	
	ф/х « Рассвет»	2009	342	9	+	+	
	кфх « Тайфун»	2010	213	7	+	+	
	спк « Чиркей»	2011	437	18	+	+	
	п/х « Кумух»	2012	37	2	-	+	
	кфх « Атланаул»	2013	190	14	+	+	
Гунибский	к-х « Чохского»	1990	670	18	+	+	Нарушение ветеринарно-санитарных правил в изоляторах, межхозяйственные связи, инфицированные корма.
	с-з « Согратлинский»	1991	1234	23	+	-	
		1998	1160	12	+	+	
	спк « Ленина «	2008	342	18	+	+	
	кфх « Коммуна»	2009	546	8	+	+	
Кулинский (Бабаюртовская зона отгонного животноводства)	с-з « Герейханова»	1986	626	13	+	-	Перегруппировки животных внутри хозяйств, вскармливание телят молоком от больных животных.
	с-з « Агасиевский»	1988	750	24	+	+	
	с-з « Калининский»	1991	906	18	+	+	
	с-з « Коммуна»	1993	470	7	+	-	
	с-з « Кулинский»	1996	577	15	+	+	
	спк « Дултыдаг»	2001	326	9	+	+	
	ф/х « Ппабаку»	2007	432	14	+	+	
	кфх « Хозрех»	2008	287	8	+	+	
Хасавюртовский	к-з « Правда»	1986	3002	35	+	-	

	к-з « М. Горького»	1987	2900	62	+	+	Комплектация животных и завоз кормов из неблагополучных хозяйств без учёта их эпизоотологического состояния.
	к-з « Ленина	1988	1780	33	+	+	
	к-з « Б. Мурзаева»	1989	1692	58	+	+	
	с-з « Бабаюртовский»	1990	960	11	+	-	
	к-з « Казбекова»	1991	769	15	+	+	
	спк « Хасовский»	1992	234	8	+	+	
	кфх « Уллубий-аул»	1993	189	10	+	+	
	п/х « Каменка2	1994	456	16	+	+	
	ф/х « Сулак»	2007	367	13	+	+	
	к-з « Правда»	2008	1674	19	+	+	
	кфх « Каспий»	2009	456	12	+	+	
	к-з « Ленина»	2010	715	20	+	+	
	кфх «Бригантина»	2011	458	8	+	+	
	к-з « М. Горького»	2014	786	12	+	+	
Кизилюртовский	с-з « Сов. Армия»	1986	1488	44	+	+	Межхозяйственные связи, перегруппировки животных внутри хозяйства, контакт больных и здоровых при длительной передержке в изоляторах.
		1987	1460	29	+	-	
	с-з «У. Буйнакского»	1988	1500	18	+	+	
	с-з « Правда»	1989	1070	29	+	+	
	к-з « Рассвет»	1990	1112	32	+	+	
	спк «Тельмана»	1991	735	11	+	+	
	спк « Героев труда»	1992	456	10	+	+	
	ф/х « Бригантина»	1993	345	14	+	+	
	кфх « Калинина»	1994	230	8	+	+	
	п/х « Аврика»	1995	45	6	+	+	
	с-з « Правда»	1996	670	13	+	+	
	спк « Авелина»	1997	379	16	+	+	
	кфх « Махачкала»	2000	456	24	+	+	
	п/х « Альбина»	2006	130	7	+	+	
	с-з « Сов. Армии»	2008	679	18	+	+	
	кфх «Чечень»	2009	460	22	+	+	
спк « Аграхан»	2010	370	12	+	+		
кфх « Казбек»	2011	217	6	+	+		

Новолакский	к-з « Мушулинский»	1986	860	32	+	-	Наличие анергичных животных в стадах и инфицированность микобактериями внешней среды.
	к-з « Жданова»	1988	729	31	+	+	
	к-з « Кр. Партизан»	1991	902	13	+	+	
	к-з « Энгельса»	1994	984	29	+	+	
	к-з « Знатные люди»	1995	500	11	-	+	
	спк « Тухчар»	1998	306	8	+	+	
	кфх « Новокули»	2000	289	13	+	+	
	н/х « Ахар»	2007	56	2	+	+	
Тарумовский	с-з « Урогинский»	1986	780	53	+	+	Комплектация животных и завоз кормов из неблагополучных хозяйств, межхозяйственные связи.
	с-з « Октябрьский»	1987	830	48	+	-	
		1989	836	43	+	+	
	с-з «Приморский»	1990	703	20	+	+	
	кфх «Кизляр»	2008	456	12	+	+	
	спк « Звезда»	2012	679	19	+	+	
	ф/х « Айлазат»	2013	324	8	+	+	
Карабудахкентский	к-з « XX11 п/съезд»	1986	6630	45	+	-	Длительная передержка больных в изоляторах, контакт больных и здоровых при пастьбе и водопое, перегруппировка внутри хозяйств, прохождение по территории скотопроектной трассы.
		1987	6700	60	+	+	
	к-з « Ленина»	1988	3970	36	+	-	
		1989	3900	28	+	+	
	с-з «Параульский»	1990	2780	22	+	+	
	с-з « Доргелинский»	1991	2100	19	+	+	
	с-з « Гелинский»	1992	1987	20	+	+	
	с-з «Рассвет»	1993	1532	15	+	+	
	с-з «Монаскентский»	1995	1136	18	+	+	
	спк «Губден»	2000	1200	13	+	-	
	кфх « Манас»	2006	768	16	+	+	
	п/х « Тарки»	2009	57	3	+	+	
	ф/х « Лагуна»	2010	356	14	+	+	
	кфх « Калина»	2011	579	20	+	+	

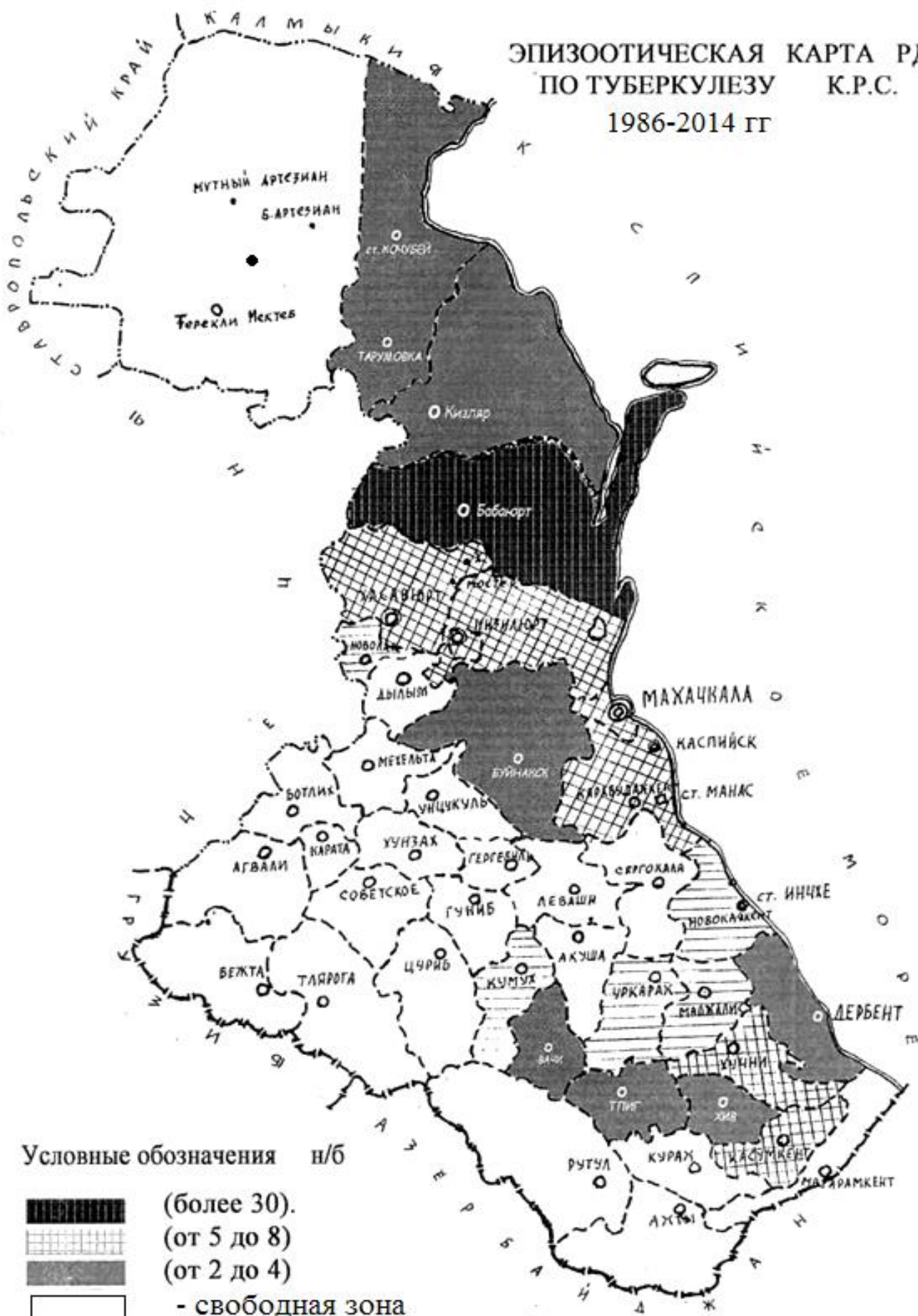
Левашинский	с-з «Жданова»	1986	950	27	+	-	Комплектация стад из неблагополучных хозяйств, наличие анергичных животных в стадах, нарушение ветеринарно-санитарных правил.
		1988	1020	23	+	-	
	к-з «К. Маркса»	1991	1349	34	+	+	
		1989	830	18	+	+	
	к-з «С. Габиева»	1992	760	16	+	+	
	спк «Ташкапур»	2008	570	14	+	+	
	кфх «Акуша»	2009	457	21	+	+	
	п/х «Аякака»	2010	79	8	+	+	
Агульский (Кизлярская зона отгонного животноводства)	к-з «Чапаева»	1986	967	34	+	-	Приобретение молодняка из неблагополучных хозяйств, низкий санитарный уровень, и использование продуктов молока и обраба без термической обработки.
		1987	879	12	+	-	
	к-з «40 лет Октября»	1992	1200	15	+	+	
	с-з «Героев труда»	1993	2600	43	+	+	
	к-з «К. Маркса»	1994	1267	21	+	+	
	к-з «Гагарина»	1995	765	16	+	+	
	с-з «Титова»	1996	1237	19	+	+	
	к-з «Полярников»	1997	786	15	+	+	
	спк «Самур»	2008	674	16	+	+	

Таблица 7

Количество вновь выявленных и оздоровленных пунктов по туберкулезу  
КРС в РД за 1987-2015 гг.

Годы	Число н/п на начало года	Выявлено новых	Оздоровлено	Осталось на конец года
1987	33	1	13	21
1988	21	3	6	18
1989	18	12	14	16
1990	16	4	11	9
1991	9	-	6	3
1992	3	2	1	4
1993	4	3	6	1
1994	1	3	2	2
1995	2	1	2	1
1996	1	2	2	1
1997	1	3	3	1
1998	1	-	-	1
1999	1	2	1	2
2000	2	1	2	1
2001	1	1	1	1
2002	1	2	2	1
2003	1	-	-	1
2004	1	-	-	1
2005	1	-	-	1
2006	1	-	-	1
2007	1	2	2	1
2008	1	4	2	3
2009	3	6	4	5
2010	5	2	3	4
2011	4	1	1	4
2012	4	1	3	2
2013	2	3	3	2
2014	2	2	3	1
2015	1	1	1	1
Всего	142	62	94	110

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ КАРТА РД  
ПО ТУБЕРКУЛЕЗУ К.Р.С.  
1986-2014 гг



### **2.2.1 Влияние зональных особенностей на эпизоотический процесс**

Республика Дагестан расположена на северо-восточном склоне Кавказа и на юго-западе Прикаспийской низменности и занимает самую южную часть Российской Федерации. Протяженность территории по прямой с севера на юг составляет около 400 км, а с запада на восток — в среднем 200 км. Площадь республики — 50,3 тыс. кв. км, что составляет 1/290 часть площади РФ с населением 2463000 человек. Границы Дагестана имеют протяженность почти 1,7 тыс. км, из которых 1/3 — морские. На севере республика граничит с Калмыкией, на северо-западе — со Ставропольским краем, на западе Чеченской республикой, на юго-западе — Грузией и на юге — Азербайджаном. На востоке территория Дагестана на протяжении примерно 590 км омывается водами Каспийского моря.

По характеру рельефа, связанным с ним природными условиями, особенностям и специализации сельского хозяйства, территория республики делится на горную, предгорную и равнинную зоны. Вертикальная зональность имеет свои характерные особенности, которые могут прямо или косвенно повлиять на проявления эпизоотического процесса. Известно, что условия внешней среды и хозяйственная деятельность человека имеет прямое отношение к возникновению и распространению инфекционных болезней. Неблагоприятные факторы внешней среды, способствующие снижению физиологической сопротивляемости организма, создают предпосылки для появления и развития туберкулеза не зависимо от породного состава животных. Результаты научных исследований отражены в статьях М.О. Баратова с соавт. (2007).

Среди регионов РФ, Дагестан занимает первое место по поголовью МРС, лидирующее место по поголовью КРС и по количеству дойных коров.



На 01. 01. 2015 г. в республике насчитывается животных (в тыс. гол). крупного рогатого скота – 949,5; мелкого рогатого скота – 5061,2; птицы – 2699,9; лошадей – 29,4; свиней -0,8; собак -40,0; кошек – 22,0; пчелосемей - 840,0.

**1. Равнинная зона.** Равнинная часть занимает весь север республики и узкую полосу вдоль берега моря до границ с Азербайджаном, высотой от 28 до 200 м. и составляет 44,3% общей территории.

Зона является частью Прикаспийской низменности, которая в пределах Дагестана подразделяется на: северную, более засушливую, с полупустынными ландшафтами (Ногайская степь); среднюю, которая охватывает дельту Терека и Сулака; и южную — узкую полосу (от 5 до 15 км) приморья от г. Махачкала до границы с Азербайджаном, которая издавна именуется Дербентским (Каспийским) проходом. Климат характеризуется засушливостью, от 200мм до 500мм годовых осадков, прохладной зимой (11,1 – 4<sup>0</sup>) и жарким летом (24 – 25<sup>0</sup>). Здесь проживает 63,2% населения Республики, из которых 67,4% - сельское.

В хозяйствах равнинной зоны содержатся на постоянной основе 37,2% крупного и 38,4% мелкого рогатого скота, кроме того на территории данной зоны в осенно-зимний период находится поголовья перегоняемого с летних пастбищ, потому как на этой территории сосредоточены все отгонные зимние пастбища республики. Кроме животноводства развито земледелие, виноградарство и садоводство. Зона по почвенно-хозяйственным условиям делится на 3 подзоны: Терско-Кумскую полупустыню, Терско-сулакскую и южную приморскую равнину. Почвы в этой зоне солончаковые с нейтральной или слабощелочной реакцией светло-каштановые, лугово-каштановые, болотистые. Растительность представлена злаково-полынными, злаково-прутняковыми и эфемерно-солончаковыми видами.

**2. Предгорная зона** тянется узкой полосой с северо-запада на юго-восток и занимает территорию восьми районов, составляя 15,8% площади Республики. Предгорье не является сплошной возвышенностью, а состоит

из множества отдельных хребтов, простирающихся с северо-запада на юго-восток на протяжении 200 км. Полоса предгорий имеет ширину от 25 до 50 км и примыкает к внешним склонам горных хребтов.

Самая благодатная в агроклиматическом отношении зона. Здесь не так жарко, как на низменности, и вместе с тем больше места для полей и поселений, чем в горах. Средняя высота предгорий 500-600 м, иногда она доходит до 1000-1200 м над уровнем моря. Предгорья сильно расчленены речными долинами и ущельями. Особенно изрезана северная часть, где передовые хребты Большого Кавказа прорезаны глубокими каньонами. На территории проживает 18% населения. Почвы тёмно-каштановые, чернозёмные, бурые, чёрно-лесные, местами солончаковые со слабо-кислой или нейтральной реакцией. Основная растительность луговая трава, зона богата лесами и кустарниками. Значительная территория занята опустынёнными степями. На территории содержится 16,2% крупного и 10,7% мелкого рогатого скота. Наибольшее развитие на территории зоны получило садоводство и зерновое хозяйство.

**3. Горная зона** занимает центральную, западную и юго-западную части республики. Он следует за Предгорным, и представляет собой цепь высоких (до 2500 м.) продольных хребтов, в основном, протянувшихся широкой полосой с северо-запада на юго-восток. Горный Дагестан отделен от предгорной части круто вздымающимися хребтами высотой 1500-2700 м над уровнем моря. Внутри этой территории расположены горные хребты, достигающие высоты 4000 м. Между цепями хребтов, на высоте 900-1800 м, находятся котловины, в которых главным образом и сосредоточено население. Склоны хребтов и долины горного Дагестана покрыты, в основном, субальпийской и альпийской растительностью. Несмотря на свою труднодоступность, они славятся лучшими в республике летними пастбищами.

Зона занимает 39,9% территории Республики, где проживает 18,8% населения. Средняя температура в июле не превышает 18 °С, в январе в

среднем составляет - 6°C. Больше количества осадков (500-1000 мм) выпадает в период с мая по сентябрь. На горно-луговых, горно-черноземных и местами лугово-степных почвах с кислой реакцией, преобладают альпийская, субальпийская растительность, а также луга лесного пояса. В зоне постоянно размещено 46,6 % крупного и 50,9% мелкого рогатого скота, кроме того на территории в летний сезон размещается пергоняемое из зимних пастбищ, поголовье.

Сельхозугодия республике составляет 3 млн. гектаров, 15,1 % из которых приходится на пашни и 84,9 % - на пастбища и сенокосы.

Распространение туберкулёза по зонам республики представлено в таблице 8.

Таблица 8

**Распространение туберкулёза крупного рогатого скота по зонам за 1987-2015 гг.**

Зоны	Всего небл. пунктов	%	Колич исслед. живот.	%	Заболело	%
Равнинная	86	60,5	8254429	43,22	25972	65,6
Предгорная	38	26,7	5674204	29,71	9977	25,2
Горная	18	12,6	5124163	26,83	3594	9,08
Всего	142	100	19098634	100	39592	100

Как видно из таблицы 8, стационарное неблагополучие всех зон республики объясняется персистенцией возбудителя туберкулеза во всех почвенно-климатических зонах республики.

Вместе с тем, анализ причин способных прямо или косвенно повлиять на эпизоотическую обстановку показал, что плоскостная зона обладает наибольшими благоприятными условиями для роста и размножения возбудителя туберкулеза, нежели предгорная и особенно горная зона.

Подтверждением является выявление наибольшего количество неблагополучных пунктов (60,5%) и заболевших животных (65,6%) в равнинной зоне, а наименьшее – 12,6% и 9,08% соответственно в горной.

Среди причин стационарного неблагополучия хозяйств в равнинной зоне следует назвать, уменьшение пастбищных угодий, что естественно приводит к ограничению сроков выпаса животных, а также концентрации большого количества животных на ограниченных площадях, где значителен контакт между животными. Такое положение сокращает сроки выпаса животных на пастбищах и увеличивает содержание их на стационаре или на ограниченных участках. Кроме того, на территории данной зоны с октября месяца по май содержатся огромное количество перегоняемого скота, занимая большие территории пастбищных угодий.

Продолжительность пастбищного периода в южной части равнинной зоны республики 360 дней, а северной – 335; в предгорной – 335 - 320; в горной зоне соответственно – 190 - 163, а в высокогорье – 159 - 119 дней. Чем выше зона над уровнем моря, тем продолжительность пастбищного периода короче. Следовательно, уменьшение пастбищных площадей в равнинной и предгорной зонах, короткие сроки их использования в горной и высокогорной, приводят к концентраций большого количества животных на ограниченных площадях в течение пастбищного сезона, увеличивая контакт между животными, способствуя постоянной циркуляцией микобактерий среди животных и в объектах внешней среды.

Не меньшее значение в эпизоотии туберкулеза в республике имеют скотопрогонные трассы, как составляющие отгонного животноводства, 53 маршрута, проходящие по территории 39 районов и 6 городов. Периодическое перемещение большого количество животных (2 раза в год), повышает риск распространения болезни в тех регионах, по территории которых проходят скотопрогоны и конечно в местах зимнего пребывания скота. Осложняют ситуацию и тесные межхозяйственные связи, особенно характерные для плоскостной зоны. Положение усугубляется еще и тем что,

экономические трудности вынуждают хозяйство производить расчеты как внутривладельческие, так и внешние, продуктами животноводческого производства, без соответствующего врачебного контроля.

Распространению болезни так же способствуют, низкий уровень санитарной культуры в животноводстве (отсутствие дезбарьеров, сан-пропускников и т.д.), ввод в стада неисследованного скота, использование молочных продуктов без термической обработки и т.д.

Анализ картографических и хозяйственно-экономических причин показал, подверженность хозяйств в равнинной зоне действиям факторов, способствующих возникновению и распространению инфекции (таблица 9).

Таблица 9

### Факторы, влияющие на эпизоотическую ситуацию туберкулеза

№ п/п	Природно-хозяйственные факторы	В условиях	
		Гор	Равнины
1.	Продолжительность и эффективность естественной санации пастбищ, территории ферм и т.д.	частота смены пастбищ, высокое бак-терцидное действие ультрафиолетовых лучей	меньшее биостерцидное действие солнечных лучей, в большинстве случаев стационарное содержание скота
2.	Растительность, использование пастбищ	Обильное разнотравье, альпийские, субальпийские пастбища интенсивное использование пастбищ	злаково-полынная, злаково-прутняковая и эфимерно-солончаковая, недостаток пастбищ
3.	Плотность размещения скота на 1 га. сельхоз. угодий	2,6 условных овец	4,7 условных овец
4.	Содержание скота: зимой летом	частичная полная пастьба	на стационаре частичн. пастьба.
5.	Межхозяйственные связи	ограниченные	интенсивные
6.	Среднее количество голов на ферме	от 50 до 200	более 300

7.	Помещения	нестандартные	стандартные
8.	Ввоз и вывоз скота	Вывоз	ввоз и вывоз
9.	Среднегодовое количество осадков	1000мм и более	до 500 мм.

Как видно из таблицы 9, факторы, способствующие повышению иммунобиологического статуса животных в хозяйствах горной зоны становятся обратно значимыми в хозяйствах предгорной и тем более равнинной зонах. Так, зеленая растительность альпийских и субальпийских лугов, высокая эффективность естественной сонаций, малые размеры ферм, где ограничен контакт между животными, значительный вывоз животноводческой продукции, ограниченный ввоз кормовой базы, незначительный контакт между животными общественного и частного сектора, способствующие повышению физиологической сопротивляемости организма животных в хозяйствах горной зоны, теряют свою значимость при переходе в предгорную и равнинную зоны.

Ограниченные пастбищные угодия, большие размеры ферм с концентрацией большого количества животных на ограниченных площадях, значительный ввоз кормовой базы, ограниченный вывоз животноводческой продукции в хозяйствах равнинной зоны, создают условия снижающей резистентность организма, а также способствующие постоянной циркуляции микобактерии в объектах внешней среды. Именно поэтому, наибольшее количества неблагополучных пунктов за последние 28 лет, приходится на равнинную зону.

### **2.2.2 Сезонная динамика туберкулеза крупного рогатого скота.**

Эпизоотический процесс туберкулеза КРС подвержен сезонным колебаниям. На зависимость интенсивности его от природно-географических и хозяйственно-экономических факторов указывают Н. А.

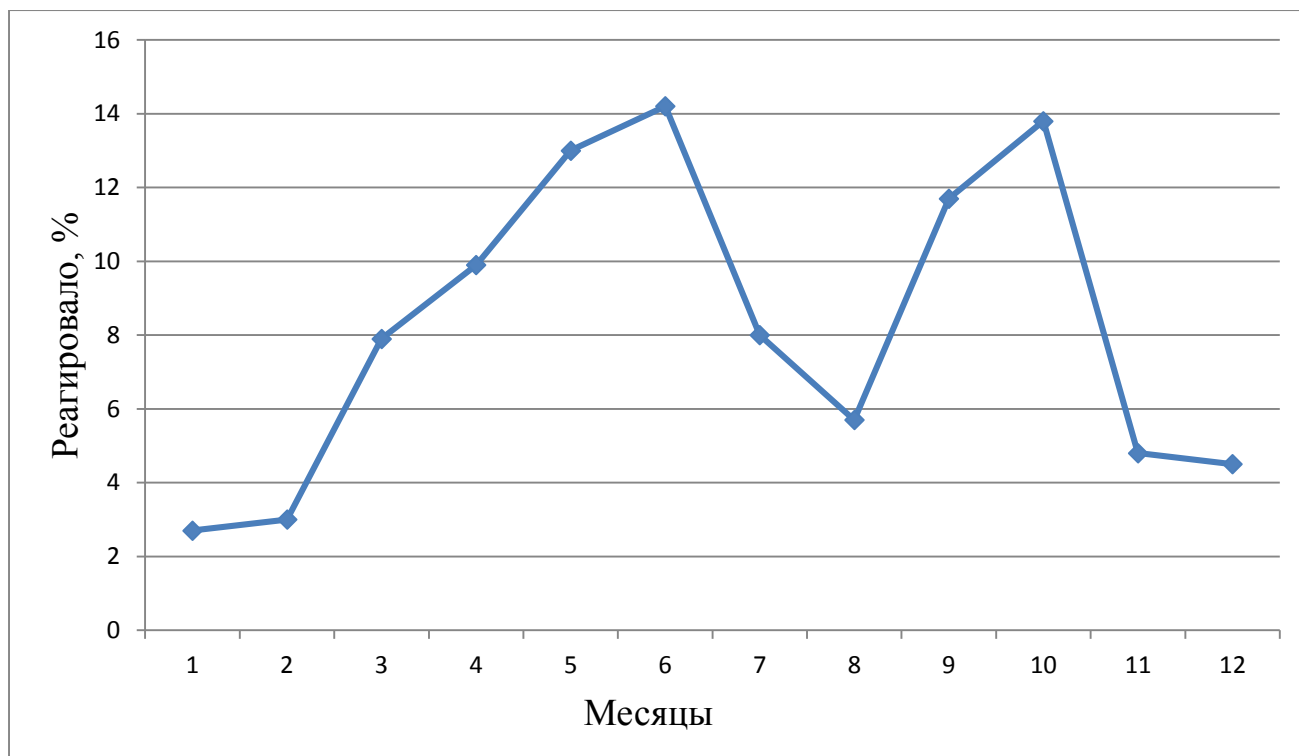
Александров (1973), А.О. Бокун (1976) и многие другие. Н. А. Шкиль и А. С. Донченко (1992) считают, что чем выше расположен регион над уровнем моря и ниже уровень грунтовых вод, тем ниже напряженность эпизоотической ситуации.

Проявление аллергических реакций у животных на туберкулин в длительно неблагополучных пунктах все еще изучена недостаточно. Хроническое течение болезни без выраженных признаков и проявление неспецифических реакций, вносят определенную путаницу в достоверность определения периода наибольшей реактивности макроорганизма к туберкулину. Поэтому, изучения данного вопроса относительно природно-климатических условий в Дагестане, имеет большое практическое значение, поскольку проведение исследований в хозяйствах позволяет приурочить их к сезонам года [25].

Для ее определения мы исходили из числа реагирующих животных в неблагополучных хозяйствах и удаление их из стада, а также в благополучных хозяйствах, после уточнения диагноза. Характер сезонной динамики заболеваемости за 15 лет определяли по суммарным показателям. Всего исследовано 6863470 голов, у 7974 животных (0,11%), диагноз на туберкулез подтвержден, причем более 83% больных животных выявлено в весенно - осенний период.

Сопоставительный анализ природно-климатических факторов в условиях Дагестана, способных прямо или косвенно оказать влияние на иммунобиологический статус, показал зависимость реактивности организма животных на туберкулин от сезонов года. Помесячная динамика за 5 лет (2010-2015 гг.) характеризуется тем, что более 70% реагирующих животных приходило на весенно - осенний период (График. 1).

График1  
Сезонная динамика реагирующих на туберкулин животных в длительно неблагоприятных пунктах.



Как видно из рисунка 1, число реагирующих на туберкулин животных заметно возрастала в весенно-осенние месяцы, на которые приходило более 70,5% реагирующих, в том числе, на ноябрь, декабрь, январь и февраль - 15,0%. При чем, число помесечно выявленных было ниже уровня среднего количество реагирующих (8,3%), март – июнь – 45,0%, а сентябрь – октябрь – 25,5%. Корреляцию между количеством исследованных и реагирующих животных проводили путем сравнения процентного соотношения их по месяцам (таблица 10).



Таблица 10

## Количество исследованных и реагирующих животных по месяцам

Показатели	Всего	Месяцы											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Исследовано (тыс. гол)	5763	356	417	384	516	479	675	450	344	735	563	481	363
%	100	6,1	7,2	6,6	8,8	8,3	11,7	7,8	5,9	12,7	9,7	8,3	6,2
Выявлено реагирующих	2134	59	66	170	213	278	305	171	123	251	296	104	98
%	100	2,7	3,0	7,9	9,9	13,0	14,2	8,0	5,7	11,7	13,8	4,8	4,5

Систематическими исследованиями животных (в течение 2-х лет) неблагополучного по туберкулезу совхоза «Улосовский» Буйнакского района, получены аналогичные результаты. При 12 - кратных исследованиях (всего исследовано 1170 голов) через каждые 45-60 дней, выявили 300 реагирующих, причём в весенний период - 31,2 %, осенний - 55,3 %. Имеются все основания считать зависимость реактивности на туберкулин от иммунобиологического состояния животных, связанная со многими внешними и внутренними факторами, условиями содержания и кормления, годовыми периодами и тд.

В зимнее – стойловый период, и связанный с этим снижение уровня иммунобиологической реактивности в неблагополучных стадах, активизируется процесс перезаражения скота. Завершение инкубационного периода практически совпадает с началом пастбищного периода, время пастбы скота, на различных высотах над уровнем моря, не совпадает по времени, с чем вероятно связано продолжительность периода выявления большого числа реагирующих животных. С переводом на пастбищное

(лагерное) содержание, процесс перезаражения приостанавливается, поскольку пастбищные участки еще не инфицированы. Затем, после их инфицирования, начинается заражение алиментарным путем и на осень приходится самый высокий процент реагирующих на туберкулин животных, так как именно осенью наиболее высок уровень иммунобиологической реактивности. Нельзя исключить и стрессовый фактор при переводе животных с пастбищного содержания на стойловое.

Исходя из изложенного, контрольно-диагностические исследования на туберкулин в хозяйствах горной и предгорной зоне считаем целесообразным проводить один раз в год – осенью, перед постановкой животных на стойло: в плоскостной зоне - два раза в год; весной (март, апрель, май) и осенью (сентябрь, октябрь). Независимо от результатов диагностических исследований постоянный контроль осуществлять осмотром туш убойных животных.

## **2.3. Совершенствования метода диагностики**

### **2.3.1. Общая характеристика коринебактерий**

Заболевание вызываемые коринебактериями были известны в глубокой древности. Еще Гиппократ описывал эпидемии дифтерии. Достоверное описание болезни коринебактериозной этиологии принадлежит историку - врачу Аретею, жившему в 1 веке нашей эры. Инфекция описывалась под разными названиями: Египетская или Сирийская болезнь, чумная язва глотки, злокачественная ангина, удушающая болезнь и т.д. Известны обширные эпидемии этой инфекции в XVII – XVIII столетиях в Европе, Англии и в Северной Америке. С первой половине XIX века эпидемия регистрировалось почти во всех странах мира, в том числе и в России.

Однако, несмотря на давность и широкое распространение указанной болезни, причины возникновения долгое время оставались невыясненными.

Этиология было окончательно расшифровано, после обнаружения возбудителя в 1883 году Clebs на срезах пленки взятых из зева больных. В последующем эти данные были подтверждены в 1884 Loffler, выделением чистой культуры и изучением некоторых свойств.

Окончательно решить вопрос об этиологической роли коринебактерий, позволили исследования Roux и Lensen (1884-1888) годах позволивший им получить коринебактериозный токсин, изученный им в последующем на животных.

Дальнейшие многочисленные работы, на фоне блестяще развивающейся микробиологии, обогащения ее новыми методами исследования, позволили начать исследования по изучению систематики коринеподобных бактерии. Термин «коринеподобные» введенный J. Orskov в 1923 году, впервые употребил Н. Jensen для группы Грамположительных, неспорообразующих бактерий неправильной формы. Однако подобный подход к классификации не позволял сформулировать понятное описание коринебактерий как таксона и научно-обоснованно показать их уникальное своеобразие.

Davis, Newton в 1969 году проанализировав более 70 штаммов коринеподобных бактерий относящихся к родам *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Kurthia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Yersinia*, *Listeria*, *Erysipelothrix* – нашли у них характерное описание. И в то же время, если учесть организмы, которые хотя бы на одной из стадий своего развития образуют неправильной формы палочки, окрашивающихся по Грамму положительно, то в эту группу можно было бы добавить роды: *Bifidobacterium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Rothia*, *Arachnia* и *Bacterionema*. Более того представители *Microsporida*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Saclaropolispora*, *Caseobacter* и таксон *Aurantiaca* тоже имеют характерные свойства.

Очевидно, что указанная классификация базировалась в основном на совокупности морфологических признаков и немногочисленных

физиологических свойств, без учета результатов серологических, хемотаксономических и генетических методов исследования.

Несомненно, востребованность бактериологических методов исследования при идентификации микроорганизмов трудно переоценить, но это первый шаг и основывание на них при детальной классификации таксонов, при определении родовых и видовых отличии, приводит к значительной путанице.

Именно поэтому, классификация была подвержено бесконечным изменениям. Начиная с 1948 года, когда редакторы составили официальный список признанных названий бактерии (сокращенный выпуск 6-го издания краткого определителя бактерии Берги) и по сегодняшний день, экспертам не удается примирить различие во мнениях [21].

В 6-м издании «Определителя Берги» признавалась семейство *Corynebacteriaceae*, включавшие роды *Corynebacterium*, *Listeria* и *Erysipelothrix*; в 7-м издании были добавлены роды *Microbacterium*, *Cellulomonas* и *Arthrobacter*. Учитывая соотношение морфологических и хемотаксономических признаков, а также свойств коррелирующих с теми и другими, (Bergey's manual of determinative bacteriology., 1974; Jensen H.L., 1952; Joness D., 1979; Keddie R.M., 1978; Veldramp H., 1970; Yamada K., 1980), в 8-м издании Берги в группу коринеформных бактерий включены роды истинных *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Caseobacter*, *Aureobacterium*, *Citrobacterium*, фитопатогенные а также сапрофитные *Corynebacterium* spp, содержащие в клеточных стенках 2,4 – диаминамасляную кислоту.

В 9-м издании «Bergey ,s Manual of Systematic Bacteriology» (1977) отмечено гетерогенность рода *Corynebacterium* и высказано предложение разделить его на несколько родов. Коринебактерий включены в группу, состоящую из 37 родов под общим названием «грамположительные, неспорообразующие палочки неправильной формы», где собраны вместе разнообразные роды из чисто практических соображений.

Факт остается парадоксальным на фоне интенсивного развития хемотаксаномии, геносистематики и современных методов анализа таксономических свойств микроорганизмов, в частности фаготипирования и генетический анализ, включая определения процента Г+Ц и анализ гомологии ДНК+ДНК.

Реализация не в полной степени потенциальных возможностей физико-химической биологии и биоорганической химии, из-за противоречивости и слабости теоретической базы – является причиной большого числа нерешенных проблем в таксономии и классификации коринебактерий.

Коринеподобные бактерии – это гетерогенная группа родственных микроорганизмов не имеющая четко определённой таксономии и классификации. Идентифицировать их даже на уровне рода нередко сложно, так как признаки присущие одному роду, могут оказаться внутривидовыми признаками другого.

Типичным представителем этой группы является коринебактерий (от греч. *korune*-булава и бактерии) – объединяющие грамположительные, неравномерно окрашивающиеся палочки. Характерной особенностью для представителей данного рода является образование фигур состоящих из расположенных под углом или примыкающих друг к другу дочерних клеток, имеющих форму коротких кокковидных или булавовидных палочек, без жгутиков, склонных к морфологической изменчивости, (см. фото 1-5). Неспорообразующие - факультативные анаэробы, обычно нуждающиеся в богатых питательных средах. Палочки с заостренными, иногда булавовидными концами, шириной 0,3-0,8 и длиной 1,5-8,0 мкм.

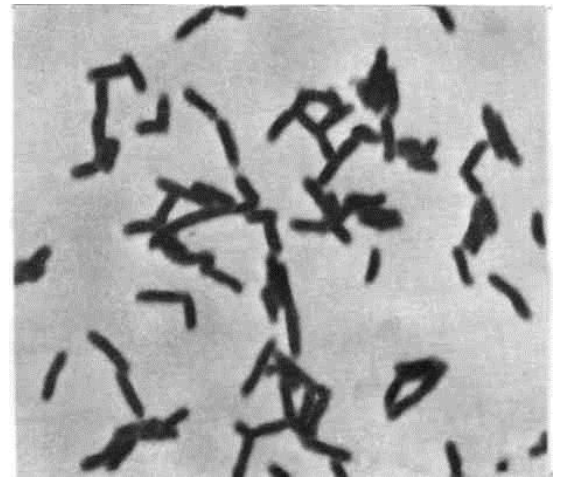
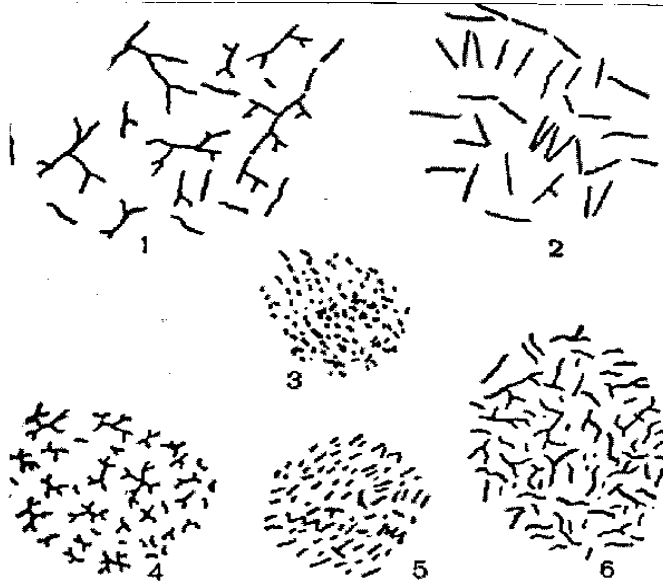


Фото 1. Общий вид: 1; 6,-булавовидные формы.2-палочковидные. Общий вид. Увел. X1200

4- расположенные под углом. 3; 5, - кокковидные



Фото 2. Кокковидные формы. Увел. X 1000

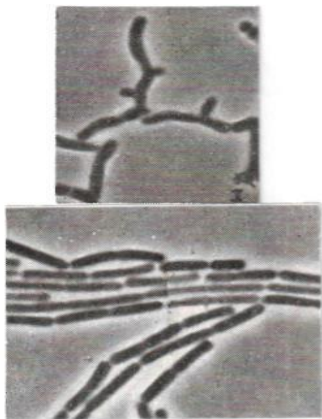


Фото 3. Прымающиеся друг к другу дочерние клетки. Увел. X 1000

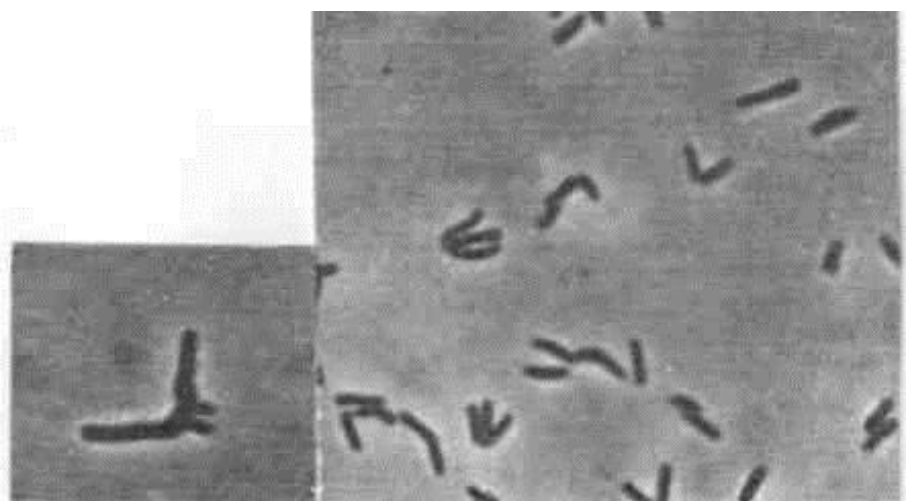


Фото 4. Клетки, расположенные под углом. Увел.

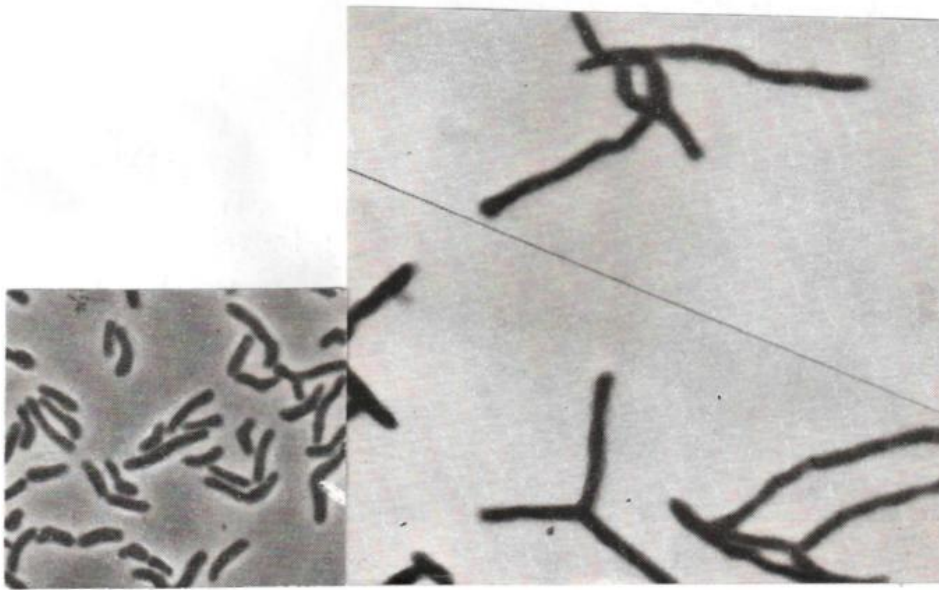


Фото 5. Булавовидные клетки. Увел.х 1000.

Увел. 1200

На основании изученных морфологических, физиологических, культуральных и хемотаксономических свойств (Квасников Е.И., 1984; Abe S., 1967; Barksdale L., 1981; Collins M.D., 1991; Gordon R.E., 1957; Yamada K., 1980; Yanagova R., 1978), описали основные дифференцирующие признаки данного рода, включением 17 видов патогенных и условно-патогенных для человека и животных и свыше 15 видов сапрофитных коринебактерий (таблица 11).

Таблица 11

#### Виды коринебактерий

Виды патогенные для человека и животных	Сапрофитные виды
Corynebacterium cystitidis	Corynebacterium flavescens (microb flavum) C. sp (B. ammoniagenes) ATCC 6871, ATCC 6872

<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. sp</i> ( <i>B. stationis</i> ) ATSS 14403
<i>C. kutscheri</i>	Синтетика глутаминовой кислоты
<i>C. matruchotii</i>	<i>C. glutamicum</i> (синонимы)
<i>C. minutissimum</i>	<i>B. ammoniagenes</i> ATSS 13745
<i>C. mycetoides</i>	<i>B. divaricatum</i>
<i>C. pilosum</i>	<i>B. flavum</i>
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	<i>B. immariophilum</i>
( <i>C. hofmani</i> )	<i>B. lactofermentum</i>
<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>B. roseum</i>
<i>C. renale</i>	<i>B. saccharolyticum</i>
<i>C. striatum</i> ( <i>C. flavidum</i> )	<i>B. acetoacidophilum</i>
<i>C. xerosis</i> NCTC 9755	<i>B. liliium</i>
<i>C. amycolatum</i>	<i>Microb ammoniphilum</i> (синонимы)
<i>C. bovis</i>	<i>C. glutamicum</i>
<i>C. jeikeium</i>	<i>A. albidus</i>
<i>C. paurometabolum</i>	<i>B. aminogenes</i>
<i>C. vitarumen</i>	<i>B. changfua</i>
	<i>B. glutamigenes</i>
	<i>B. taipei</i>
	<i>C. callune</i>
	<i>C. herculis</i>
	<i>C. melassecola</i>

Вместе с тем, при рассмотрении таксономического положения видов коринебактерий нужно иметь введу и культуры близкородственных родов,



диагнозы которых перекрываются в связи с неопределённостью границ, а также большое количество видов рассматриваемых как промежуточные группы. Критерием рода истинных коринебактерий соответствует патогенные и условно-патогенные для человека и животных виды; *Corynebacterium diphtheriae*, *C. minutissimum*, *C. pseudodiphtheriticum*, (*C. hofmani*), *C. pseudotuberculosis*, *C. renale*, *C. xerosis* NCTC 9755, *C. matruchotii*, *C. cystitidis*, *C. pilosum*, *C. kutscheri*, *C. striatum* (*C. flavidum*), физиолого-биохимические признаки которых отражают идентификационные родовые свойства.

Характерным и наиболее постоянным признаком не зависящем от среды и условий культивирования, при определении видов коринебактерий – является клеточная стенка. Установлено (Нестеренко О.А., 1976; Lechevalier M.P., 1976; Michel G., 1976), что по содержанию в клетках определённых наборов сахаров (типы А-Д) и изомеров диаминопименовой кислоты (ДПК) легко удастся установить I-IV типы клеточной стенки. Коринебактерии характеризуются содержанием в качестве дифференцирующих компонентов мезо-ДПК, арабинозы и галактозы, что определяет IV- тип клеточной стенки (Corner Z., 1981; Jensen H.L., 1934). Многослойная состоящая из 9 слоёв структура, (фото 6), причём особенно дифференцирующая у токсигенных штаммов, обладает значительной биологической активностью и определяет многие свойства этих микроорганизмов. Предполагают (Высоцкий В.В., 1976), что многослойность стенок клеток, обладающих токсигенной активностью, свидетельствует об их более сложном антигенном составе.

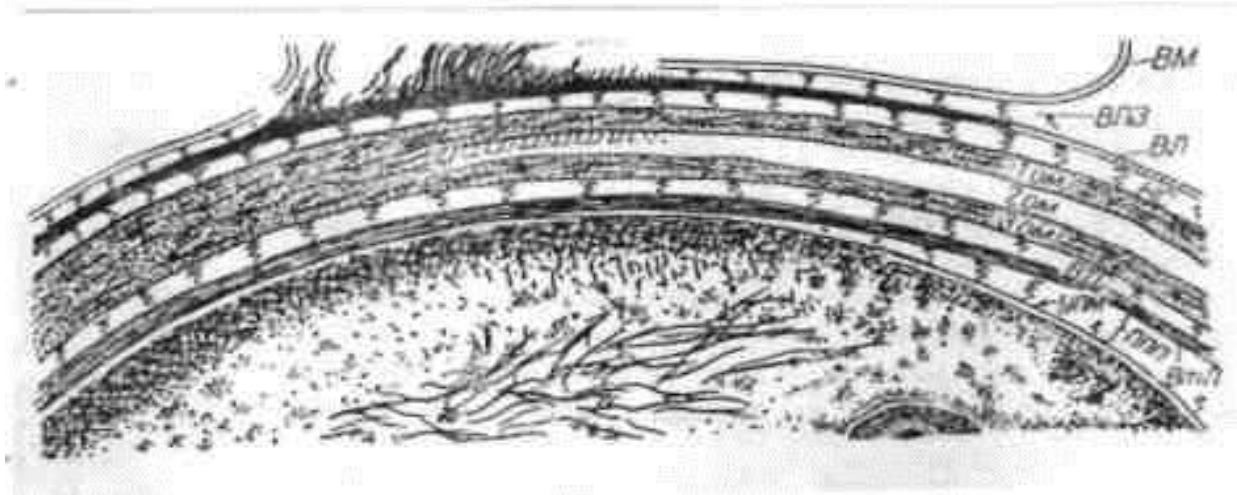


Фото 6. Строение клеточной стенки коринебактерий. ВМ-внешняя мембрана, ВЛЗ- внешняя прозрачная зона. МК- микрокапсула, ВЛ-внешний плотный листок стенки, НС-наружный слой пониженной плотности, 1ОМ, 2ОМ-слои основного массива стенки, ВмС-внутренний слой пониженной плотности, ВмЛ-внутренний плотный листок стенки, Ц-цитоплазма, ППП-периплазматическое пространство, ЦПМ-цитоплазматическая мембрана.

Вместе с тем, большинство видов *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* тоже имеют в клеточных стенках перечисленные компоненты, что является отражением родового родства. В целом химический состав клеточных стенок рассматривают как наиболее важный элемент в определении родственных отношении между микроорганизмами (Нестеренко О.А., 1976; Emeruwa A.C., 1981; Ratledge C., 1977).

Цитоплазма коринебактерий представлена смесью коллоидов из воды, белков, углеводов, липидов, минеральных веществ и мелких зерен, в которых кроме ферментов содержатся гранулы валютин. (фото 7). Это обособленное отложение питательных веществ в виде белков, жиров и углеводов, они обычно не принимают участие в обмене веществ клетки, но расходуются при недостатке питательного материала в окружающей среде и даже могут стимулировать структурные особенности протоплазмы. Кроме того, гранулы валютин или тельца Бабеш-Эрнста, отличаются способностью окрашиваться более интенсивно, чем цитоплазма, придавая коринебактериям явления метохромазии.

Рядом авторов (Тропина В.И., 1982; Lechevalier M.H., 1977; Minnikin D., 1978; Minnikin D., 1980), установлено, что коринебактерии имеют не

зависящие от состава питательной среды спектр липидов, общее количество которых варьируется в пределах 3-6% веса сухой биомассы в зависимости от фазы роста основными компонентами которых, от суммы всех липидов, является гликолипид не установленного строения (60-80%). Кроме того в состав липидов входят фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерин, фосфатидилинзит, фосфатидилинзитманнозиды, минорный гликолипид, моно - ди и триглицериды, свободные жирные кислоты, углеводороды в следовых количествах, стеринны и эфиры стериннов. Наличие в значительных количествах таких специфических соединений на поверхности определяют

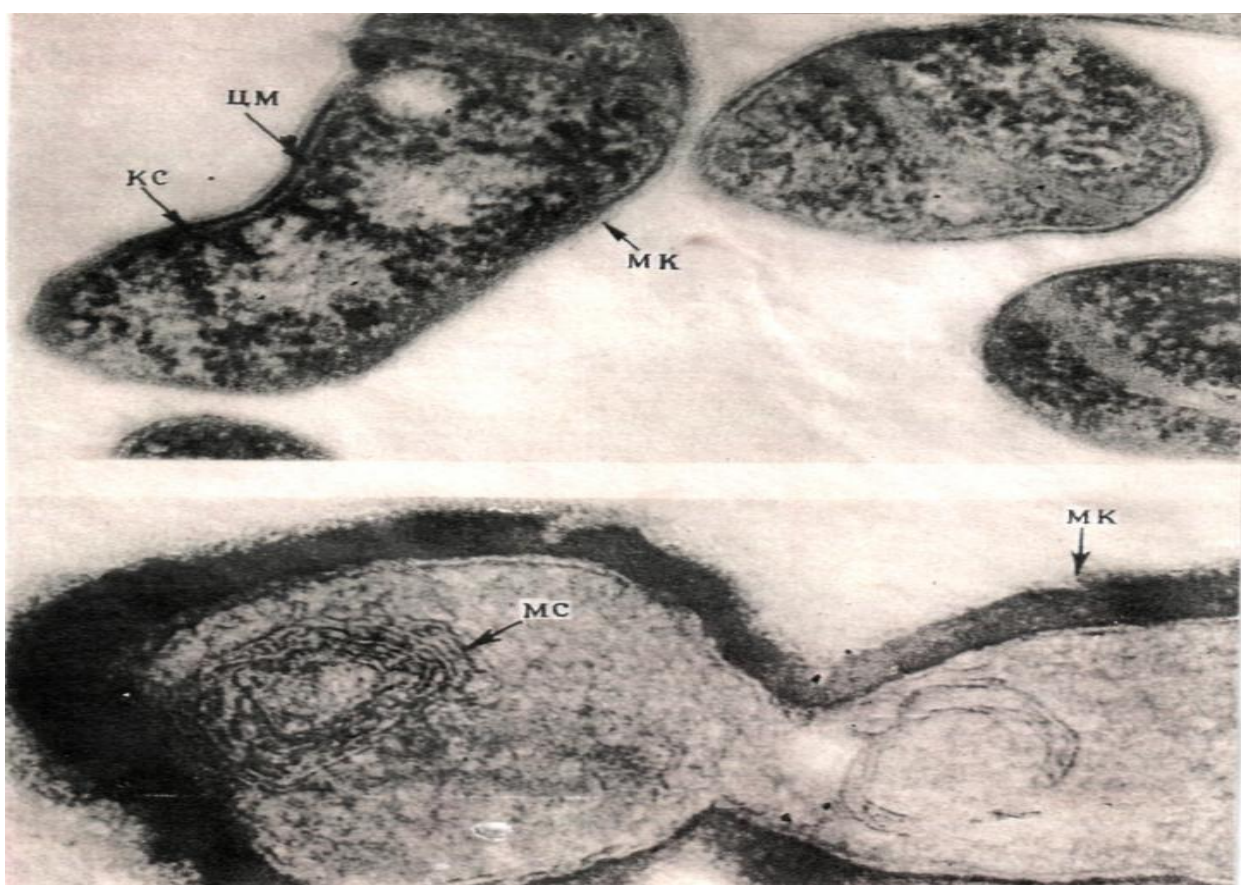


Фото 7. Коринебактерий. Полиморфные клетки. МК-микрокапсула расположена равномерным слоем. ЦМ-цитоплазматическая мембрана в виде извилистой однослойной структуры. КС-клеточная стенка. Увел. X 70 000. МС- сложные мембранные структуры в цитоплазме. Увел.х100 00.(А.А. Авакян, Л.Н.Кац, И.Б. Павлова. 1972).

липофильность коринебактерий, чем и объясняется сильно развитую у них способность усваивать углеводороды (Коронелли Т.В., 1977). Кроме того, имеются данные, указывающие на прямую зависимость вирулентности от

толщины липидного слоя клеток: у токсигенных штаммов лучше проявляется слоистость, тогда как у интактных липидный слой сливается с материалом стенки и цитоплазмой (Высоцкий В.В., 1968; Высоцкий В.В., 1979).

С составом липидов также во многом связаны такие свойства коринебактерий как адаптация к различным условиям внешней среды (температура, тип почвы, концентрация солей, специфические условия водоёмов и т.д.). Кроме того, липиды выполняют функцию запасных продуктов. Поэтому, изменения общего состава липидов или их компонентов может отразиться не только на степени проницаемости клеточной мембраны, но и на уровне их активности. Не исключается возможность участия липидов в активации ферментов (Коронелли Т.В., 1977).

Вместе с тем, липидный слой клеток широко используется для дифференциации коринебактерий от нокардоподобных (Minnikin D.E., 1976; (Minnikin D.E., 1978). Для культур родов *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* характерно содержание в клетках миколовых кислот - разветвлённые 3-гидроксикислоты ( $R_1-CH(OH)-CHR_2-COOH$ ), которые в положениях 2 и 3 замещены алифатическими цепями. Различная длина этих цепей может быть использовано для межродовой идентификации. Наиболее простую структуру и наименьшее число атомов углерода имеют коринемиколовые кислоты (C 22-28) выявляемых у истинных *Corynebacterium* (Collins M.D., 1982; Minnikin D.E., 1978; Pudles I., 1954). Миколовые кислоты микобактерий характеризуются содержанием значительно большего числа атомов углерода в цепи (60-90) и при пиролизе освобождают жирные кислоты с числом атомов C<sub>22-26</sub>, тогда как у последних обнаруживают C<sub>10-18</sub>.

Способность к такому «сверхсинтезу» липидов делает поверхность микобактерии воскообразной и сильно гидрофобной, что обуславливает их кислотоспиртощелочеустойчивость. Кроме того, для микобактериальных миколовых кислот характерно наличие в главной цепи разнообразных

заместителей – метильных, кета - и карбоксильных групп, циклопропановых колец и др. (Etemadi A.H.,1967).

В клетках коринебактерий преобладают прямоцепочечные насыщенные и мононасыщенные жирные кислоты (Bousfield L.I.,1983; Collins M.D.,1980; Suxuri R.I., 1983).

У некоторых патогенных культур *Corynebacterium* в частности *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis*, *C. renale* обнаружен токсичный гликолипид -6,6- диэфиртрегалозы, создающий коринемиловую ( $C_{32}H_{64}O_3$ ) и коринемиколоновую кислоты ( $C_{32}H_{62}O_3$ ) в одинаковых соотношениях. Таким образом, этот гликолипид - низший миколовокислый аналог корд-фактора *M. tuberculosis*, который представляет собой трегалозу – 6,6 – димиколат (сложный эфир трегалозы и миколовой кислоты), (Asselineau C.,1978; Barksdole L., 1970; Barksdole L., 1979; Ioneda T., 1981; Minnikin D.E.,1978). Известно, что потеря корд-фактора приближает вирулентные формы к авирулентным, что, несомненно, доказывает его ведущую роль в активности коринебактерий. Однако, не смотря на очевидную дифференцирующую роль миколовых кислот, сформулировать диагнозы родов в группе *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, только по данному признаку не возможно, так как границы между нокардиями и родококками, родококками и коринебактериями перекрываются (Барышников Л.М., и др., 1982).

Наряду с хемотаксономическими признаками для дифференциации коринебактерий широко используют физиолого-биохимические признаки, поскольку они отражают адаптацию микроорганизмов к определённым экологическим нишам (Барышников Л.М., и др., 1982). Характерной особенностью для коринебактерий (особенно для патогенных форм), населяющих слизистую ротовой полости и желудочно-кишечного тракта животных, является способность к анаэробному катаболизму глюкозы, предпочтительный рост на углеводах, а не на алифатических соединениях, а

также присутствия липида LCN-A (Нестеренко О.А., и др., 1978; Cummins C.S., 1956; Pine L., 1974).

Установлено (Нестеренко О.А., и др., 1978), что при наличии в гидролизатах клеток бактерии, арабинозы, галактозы и мезо-ДПК в них всегда присутствует липид LCN-A. Такое положение хемотаксономических свойств является весьма ценным диагностическим признаком коринебактерий, служащий для дифференциации их от родственных представителей.

Вместе с тем, липиды, являясь составной частью клеточных органелл, играют важную роль в процессах метаболизма, участвуют в переносе различных веществ через мембрану и распределении их внутри клетки, тем самым определяют многие свойства коринебактерий.

Общим и довольно стабильным признаком является и структура пептидогликана, отнесённая по классификации в группу А (Lechevalier M.P., 1977; Minnikin D.E., 1978; Minnikin D.E., 1980; Veldramp H., 1970). Установлено, что одноступенчатая мутация не приводит к изменению пептидогликанового типа. Однако модификации последнего могут быть вызваны изменением аминокислотного состава среды, действием ингибирующих количеств пенициллина и способами очистки муреина (Minnikin D.E., 1978; Pitcher D.C., 1983; Yamada K., 1972). Количественное содержание пептидогликана в клеточных стенках может изменяться с возрастом культур. У коринебактерий глюкановая часть пептидогликана содержит N – ацетилмурамовую кислоту, чем и отличается от прямопоперечносвязанного типа пептидогликана микобактерий, нокардий и родококков, где N – ацетильная группа мурамовой кислоты замещена N – гликолильной (Etemadi A.H., 1967; Jensen H.L., 1952; Pine L., 1974).

Нуклеотидный состав ДНК коринебактерий отличается от нокардоподобных самым низким составом ДНК (51-61% ГЦ) (Collins M.D., 1982; Minnikin D.E., 1978). Полагают, что определение генетической структуры *Corynebacterium*, способных вызывать клинически сходные

инфекции у человека и животных, является одним из наиболее перспективных направлений в исследованиях. Более всего внимание исследователей привлекает большой спектр биологической (иммунологической, токсигенной) активности и мощные адьювантные свойства коринебактерий. Установлены различия в количественных соотношениях антигенов в клетках нетоксигенных и токсигенных штаммов (Высоцкий В.В., 1976). Причём у последних набор антигенов оказался значительно полнее. С помощью серологических методов выявлены преципитиногены X и Y, локализованные в рибосомах клеток коринебактерий (Ridell M., 1977; Ridell M., 1979). Считают, что основной антиген, локализованный в цитоплазме, представляет собой комплексное соединение полисахаридов, нуклеиновых кислот и белков (Ridell M., 1977). Отмечают, выраженную гетерогенность по антигенным свойствам у *Corynebacterium*, особенно у патогенных культур и лёгкость формирования новых серовариантов (Ряпис А.А., 1998; Boyd E.E., 1994).

Несмотря на ограниченные и весьма противоречивые данные, имеющиеся сведения позволяют предполагать близкое родство антигенной структуры коринебактерий с микобактериями. По данным (Janica B.M., 1971; Лазовская А.А., 1976), из 11 антигенов изолированных из клеточного экстракта микобактерии, только 1 оказался родоспецифическим, остальные имели группоспецифическую структуру, в том числе и с коринебактериозными антигенами. Уникальная клеточная структура этих таксонов, представленная комплексом миколовая кислота-арабиногалактан-пептидогликан, может быть рассмотрено как антигенный детерминант (Варбанец Л.Д., 1988). Так по данным (Yano J., 1978), арабиногалактановая вытяжка микобактерий, реагировала с противоклеточными антигенами БЦЖ и коринебактерий, что является показателем антигенной однородности. Такое положение подтверждает и многочисленные перекрестные иммунологические реакции проб сывороток с гетерологичными заражению

антигенами. Все это дает основание рассматривать коринебактерий как объект сенсibilизации макроорганизма к туберкулину.

Состав менахинонов, содержание которых у *Corynebacterium* составляет МК -8 (Н), МК -9 (Н), считается стабильным признаком, но многие исследователи указывают на сложность различия коринебактерий от коринеформных и нокардоподобных бактерий по ним (Suxuri R.J., 1983; Slack J.M., 1975; Yamada K., 1980).

### **2.3.2. Биосфера и эволюционная приспособленность их к макроорганизму**

Несмотря на общепризнанную исключительную роль микроорганизмов в биосфере, почвенная микрофлора исследована в недостаточной степени, особенно в условиях Дагестана.

Микробная экосистема интересна и тем, что обеспечивает постоянство внутренней среды макроорганизма. Наличие в кишечнике животных оптимального количества условно-патогенной микрофлоры обеспечивает неспецифическую защиту организма, способствует выработке факторов иммунной защиты. Некоторые виды коринеподобных бактерий участвуют в синтезе витаминов и незаменимых аминокислот. Вместе с кишечной микрофлорой, указанные бактерии участвуют в расщеплении и всасывании продуктов обмена липидов, белков и углеводов. Каринеподобные бактерии способны к усвоению газообразного молекулярного азота. Благодаря азотфиксирующей деятельности бактерии в почву ежегодно поступает не менее 30-50 кг связанного азота (Умаров 2001).

Кроме того, коринеподобные микроорганизмы отличаются высокой биохимической активностью. В процессе своей жизнедеятельности они используют жиры, белки, углеводы, кислоты и различные другие органические, а также и минеральные соединения, подвергая субстраты глубоким химическим изменениям, тем самым, участвуя в процессах



почвообразования и обогащения биоценозов витаминами и другими физиологически активными соединениями.

Помимо этого, представители коринеподобных микроорганизмов, являясь близкими родственниками микобактерии, посредством общих родоспецифических, морфо-культуральных, хемотаксономических и генетических свойств, представляют интерес как потенциальные источники сенсibilизации макроорганизма к туберкулину.

Целью настоящей работы явилось, изучение степени распространения коринебактерий в почве, в различных природно-географических зонах республики (горная, предгорная и равнинная), которые имеют характерные почвенно-климатические особенности [18,19,22,29,39,46]

Исследование проводили по следующим направлениям:

- Распространение коринебактерий в горной, предгорной и равнинной зонах.

- Циркуляция их в организме животных и продуктах животного происхождения.

Обсемененность коринебактериями объектов внешней среды изучали на пробах почвы – 180, кормов (комбикорма, солома, остатки силоса в кормушках) – 260, воды из разных источников – 250, навоза – 150, отобранных из разных населенных пунктов равнинной зоны республики.

Пробы высевали на среду Бучина в разведениях до  $10^{-8}$ , в зависимости от загрязнения и на накопительную синтетическую среду с п – алканами, и среду Сотона.

На среде Бучина, в аэробных условиях, через 48 часов обнаружили хороший рост культур при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Колонии, диаметром 2-2,5 мм, гладкие, серовато розового цвета в титре  $1 \times 10^3$  микробных тел, выделены из проб навоза. Колонии, полученные из посевов проб кормов, характеризовались неровными краями, серовато коричневого цвета в титре  $2,9 \times 10^3$  микробных тел.

В пробах почвы обнаружили самый высокий титр  $12 \times 10^6$ , колонии серовато-темного цвета.

Хорошими ростовыми свойствами обладала и среда Сотона, с добавлением углеводов (n-алканов).

В накопительной синтетической среде с n-алканами (октан, ундекан, тетрадекан) выращиванием в аэробных условиях в течение 7 суток не удалось обнаружить заметного роста.

По результатам микроскопирования обнаружены, Грам - положительные палочки с явлениями метакромазии, встречаются разнообразны формы: булавовидные, выпуклые, V- образные, длинные сросшиеся размером от 0,5 до 6 мкм, толщиной до 2 мкм с неровными краями. Концы палочек заостренные, встречаются и с обрубленными концами. Палочки, неподвижные, некислотоустойчивые, тест на образование каталазы, пероксидазы и цитохромоксидазы положительный у большинства исследованных культур. Изменение малинового цвета индикатора в желтый по всей длине пробирки в тесте (Hugh R, Leifson E), показывает на способность указанных таксонов анаэробно усваивать глюкозу [20,31,35,44].

Большинство выделенных культур показывали способность гидролизовать крахмал, желатин, твин-40,60,80, аллантаин и восстанавливать теллурит и нитрат в нитриты. На хроматограмме диаминопименовая кислота (ДАПК), имела зеленовато – желтые пятна, располагающиеся ниже других аминокислот, имеющих сиреневато - фиолетовую окраску. Следует, отметить, что, наличие ДАПК, обнаружили не у всех штаммов. У большинства исследованных культур тест на липид LCN- А, положительный.

Для определения циркуляции коринебактерий в организме животных и в продуктах животного происхождения исследовали: 90 проб крови крупного рогатого скота реагирующих на ППД-туберкулин, 30 проб молока из прикутаных хозяйств 6-районов (по 2 с каждой зоны), 35- лимфатические узлы (бронхиальные, заглочные и средостенные), отобраны в мясном

отделе центрального рынка г. Махачкала. Посевы проб производили на среде Бучина, кровяной и кровяно-теллуритовый агар [37,41,46,47].

Отмечено рост микроорганизмов сплошным газоном в 2-пробах на среде Бучина, 4-х и 5 на кровяном и кровяно-теллуритовых соответственно, что является показателем низких ингибирующих свойств 2-х последних сред. В остальных пробах на среде Бучина изолированные гладкие колонии, размером от 1,5 до 3 мм, с ровными краями, сероватого цвета. На кровяно – теллуритовой среде колонии темно-коричневого цвета.

Результаты морфо-функциональных и физиоло- биохимических свойств подтвердили принадлежность выделенных таксонов к роду *Corynebacterium*.

Распространенность коринебактерий в объектах внешней среды, равнинной части республики, где на протяжении многих лет сохраняется напряженная ситуация по туберкулезу, нами показана в многочисленных работах [18,19,22,29,35]. В то же время, в условиях благополучных по туберкулезу зон (горная и частично предгорная), где регулярно выявляются реагирующие на туберкулин животные, но диагноз подтвердить другими методами исследования не удастся, степень распространения данных таксонов представляет не меньший интерес.

В этой связи, пробы почвы были отобраны в горной, предгорной и равнинной зонах, по следующему принципу, в каждой зоне выбрали по три района, и в каждом районе по три хозяйства, которые в свою очередь разбили на два участка (орошаемый и пастбищный). С опытного участка отбирали по 5 проб весом 0,5 кг каждая, смешивали и готовили средний образец весом 1 кг. Итого с района-6 проб, зоны-18, всего 54 пробы. См. Схему.

Параллельно были отобраны пробы крови, кормов и навоза. Кровь от реагирующих на туберкулин животных, высевали растиранием капли шпателем на поверхность среды Бучина, затем последовательно еще на 5 чашек [37, 40].

Суспензию почвы и разведение до  $10^{-8}$  готовили по общепринятой схеме. Посев производили на селективную среду Бучина, культивировали в термостате при  $t 37^{\circ}\text{C}$  в течение 2 суток в аэробных условиях.

Диаметр выросших колонии от 1,0-1,5 до 2,0-2,5 мм., темные, темно-синие, круглые, встречаются шероховатые с неровными краями, блестящие. Эти результаты подтверждены, люминесцентной микроскопией, т.е. обнаружением зелёного цвета палочек на фоне коричневых конгломератов, а также результатами исследования физиологических свойств.

Содержание микробных тел в 1 гр. почвы составило:  $4,7 \times 10^{-5}$  - в орошаемых и  $3,6 \times 10^{-4}$  - в пастбищных участках в равнинной зоне;  $1,6 \times 10^{-4}$  и  $9,5 \times 10^{-3}$  - в предгорной и  $1,3 \times 10^{-3}$  и  $0,8 \times 10^{-3}$  в горной зонах соответственно (таблица 12).

Таблица 12

Результаты лабораторного изучения выросших культур

№	Свойства	Культура					
		Почва			Кровь	Навоз	Корма
		Горная зона	Предгор-я зона	Равнинная зона			
1	Рост при $t 37^{\circ}\text{C}$ на среде Бучина.	+	+	+	+	+	+
2	Скорость роста (сут.)	2-3	2-3	2-3	3-5	3-4	3-6
3	Титры	$1.3 \times 10^3$	$1.6 \times 10^4$	$4.7 \times 10^5$	$6 \times 10^4$	$175 \times 10^5$	$84 \times 10^4$
4	Рост на накопительной среде с н-алканами	7% +	20%+	24%+	2%+	1%+	1,5%+
5	Окраска по Граму	+	+	90%+	+	98%+	+
6	Подвижность	-	-	-	-	-	98%-

7	Кислотоустойчивость	-	-	-	-	-	-
8	Тест на липид LCN-A	+	+	+	90%+	+	+
9	Тест (R.Ниж- E.Lefson)	+	+	90%+	96%+	78%+	+
10	Тест на каталазу -Пероксилазу -Цитохромоксидазу	+	+	+	+	+	+
11	Чувствительность к -0,1% олеату Na -8% NaCl -4% K	+	-	+	+	-	-
		-	+	-	-	-	-
		-	-	+	+	+	+
12	Разложение: -Крахмала -Желатина -Козеина -Твина 40 -60 -80	+	-	-	+	+	+
		-	-	-	-	+	-
		+	+	-	-	-	+
		+	+	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+
		-	+	+	+	+	+
13	Восстановление нитратов в нитриты	90%+	80%+	98%+	70%+	60%+	90%+

Проведенные исследования показали, что объекты внешней среды независимо от эпизоотической ситуации по туберкулёзу контаминированы коринебактериями. Выделенные таксоны имеют четкую корреляцию по изученным свойствам, хотя обнаруживались штаммы с нехарактерными свойствами. Данная ситуация является прогнозируемой, если учитывать, что микроорганизмы, находящиеся в условиях внешней среды, подвержены действиям многочисленных физико-химических и биологических факторов, способствующих изменению их свойств.

Вместе с тем, результаты наших исследований свидетельствуют о наличии природно-географических особенностей в содержании

коринебактерии в почве. Особенность этих микроорганизмов к жизнедеятельности в олиготрофных условиях, при пониженных температурах, способность использовать не доступные другим микроорганизмам органические соединения, подчеркивает изолирование их из слобо-гумусированных почв горной зоны [35,37,38,46].

Контрастный по влажности биogeоценоз равнинной зоны, является благоприятной средой для развития углеводородсодержащих микроорганизмов, чем и объясняется их доминирование.

Приспособительный характер способствует адаптации коринебактерий не только к меняющимся условиям внешней среды, но и существованию как внутри организма животного и человека, так и на поверхности. Подобное взаимоотношение условно-патогенных коринебактерий с макроорганизмом как составной части нормальной микробной экосистемы, благоприятно для организма. Кроме того и потенциально-патогенные виды при оптимальном экологическом балансе не представляют опасности для макроорганизма. Однако, в результате действия неблагоприятных факторов способствующих нарушению микробной экосистемы а следовательно, экологического баланса микроорганизмов, патогенные коринебактерии начинают активно размножаться, что приводит к заболеванию. В этом плане коринебактерии выступают в роли показателя болезни как нозологическая единица, а определяющим являются факторы, способствующие снижению иммунобиологического статуса организма [19,35,37].

С развитием микробиологии и совершенствованием методов изолирования расширились и представления о коринебактериях. Установлено широкая обсемененность организма животных и человека представителями данного рода, которые активно выделяются во внешнюю среду.

На поверхности кожи у животных обитают многочисленные количества сопрофитных, условно-патогенных коринебактерий. Наиболее часто инфицируются кожные покровы крупа, ягодичной области, живота,

грудинной и подчелюстной области, нередко являясь причиной гнойничковых поражении кожи животного, а также открытых частей человеческого тела.

В частности, *S. pseudodiphtheriticum* рассматривается как представитель нормальной микрофлоры кожи человека и животных. *S. pseudotuberculosis* – вызывает кожные абсцессы у овец, коз, и лошадей. (Barksdale L., 1970; Barksdale L.,1981), *S. minutissimum*, *S. mycetoides*, изолированы от больных эритразмой, характерные кожные поражения человека. (Mcbride M.E., Montes L.E., Knox J.M., 1970).

Ротовая полость с оптимальной температурой, достаточным количеством питательных веществ, слабощелочной реакцией, является благоприятной средой для многих видов патогенных и условно-патогенных коринебактерий. В отличие от сопрофитных видов, которые являются естественными обитателями слизистой оболочки рта, патогенные коринебактерий поступают вместе с кормом, водой, и воздухом. *S. pseudotuberculosis* вызывает в ротовой полости и на слизистой зева абсцессы с язвенно- некротическими очагами, язвенные лимфадениты, *S. ruogenes* - язвенно-некротические поражения в виде гингивитов, стоматитов, фарингитов и тонзиллитов. Наибольшее количество обнаруживается, у шейки зубов и в зубных промежутках. *S. matrychoti* – выделяют из отложения зубного камня человека, является причиной кариеса и пародонтита. (Lipsky B.A., Goldenberger A.C., Topkins K.S., Plorde J. J., 1982).

В желудочно – кишечном тракте, при нормальном функционировании, отсутствуют патогенные и условно – патогенные коринебактерий, так как, желудочный сок является надежной защитой от вредоносных видов. В то же время, постоянный характер степени кислотности желудочного сока в организме животных явление редкое, в результате чего многие патогенные виды беспрепятственно поступают из ротовой полости в желудок вместе с кормом, а затем и в кишечник [35,36,38,39,41].

Системные болезни животных, как нозологические единицы, вызываемые коринебактериями, на сегодняшний день известны немного, хотя при неблагоприятных условиях они в ассоциации с другими видами микроорганизмов вызывают самые разнообразные по клиническому течению заболевания. Из содержимого желудка, а также из фекальных масс, где коринебактерий содержится в огромных количествах, изолированы: *C. bovis*, *C. ruogenes*, *C. pseudotuberculosis*, *C. renale*, *C. cystitidis* и др. (Yanagowa R, Honda E, 1978., Ridele M, 1977., Minnikin D.E., Goodfellow M, Collins M. D., 1978).

Животные вдыхают с воздухом огромное количество микроорганизмов, адсорбированных на частицах пыли. Установлено, что количество микроорганизмов содержащихся в вдыхаемом воздухе в 500-600 раз больше, нежели в выдыхаемом. В верхних дыхательных путях (носоглотка, зев), ровно, как и в полости носа, несмотря на наличие бактерицидных веществ (муцин, лизоцим), содержится несколько относительно постоянных видов коринебактерий: *C. ulcerans*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. striatum* (*C. flavidum*). (Collins M.D., Goodfellow M, Minnikin D.E. 1982), которые могут в течение длительного времени существовать, не вызывая патологических процессов. В то же время, в условиях ослабления защитных сил организма (термические перепады, истощение, болезни и т.д.), становятся причиной язвенно-некротических поражений слизистой оболочки.

На слизистых оболочках половых органов, мочеиспускательных путей, находят оптимальные условия для своего развития *C. renale*, *C. cystitidis*, *C. pilosum*. Возможно, они становятся причиной циститов и пиелонефритов у животных и человека. (Lipsky B. A., Goldenberger A.C., Topkins K. S., Plorde J.J. 1982., Yanagowa R., Honda E., 1978).

В сосковом канале встречается *C. bovis*, вызывая пороки вкуса в сыром молоке и сыре. От больных маститом коров изолируется *C. striatum*, а также *C. pseudotuberculosis*, при идентификации очень схожая с *C. diphtheriae* (Крылова М.Д. 1976., Sulsa J.T., Pollice M. C., Barsdale L., 1980).



Высказывается предположение, что *C. diphtheriae* и *C. pseudotuberculosis*, принадлежат к одному виду, включающему несколько вариантов, каждый из которых, может быть, патогенен для человека и животных. (Barksdale L, 1970., Barksdale L, 1981)

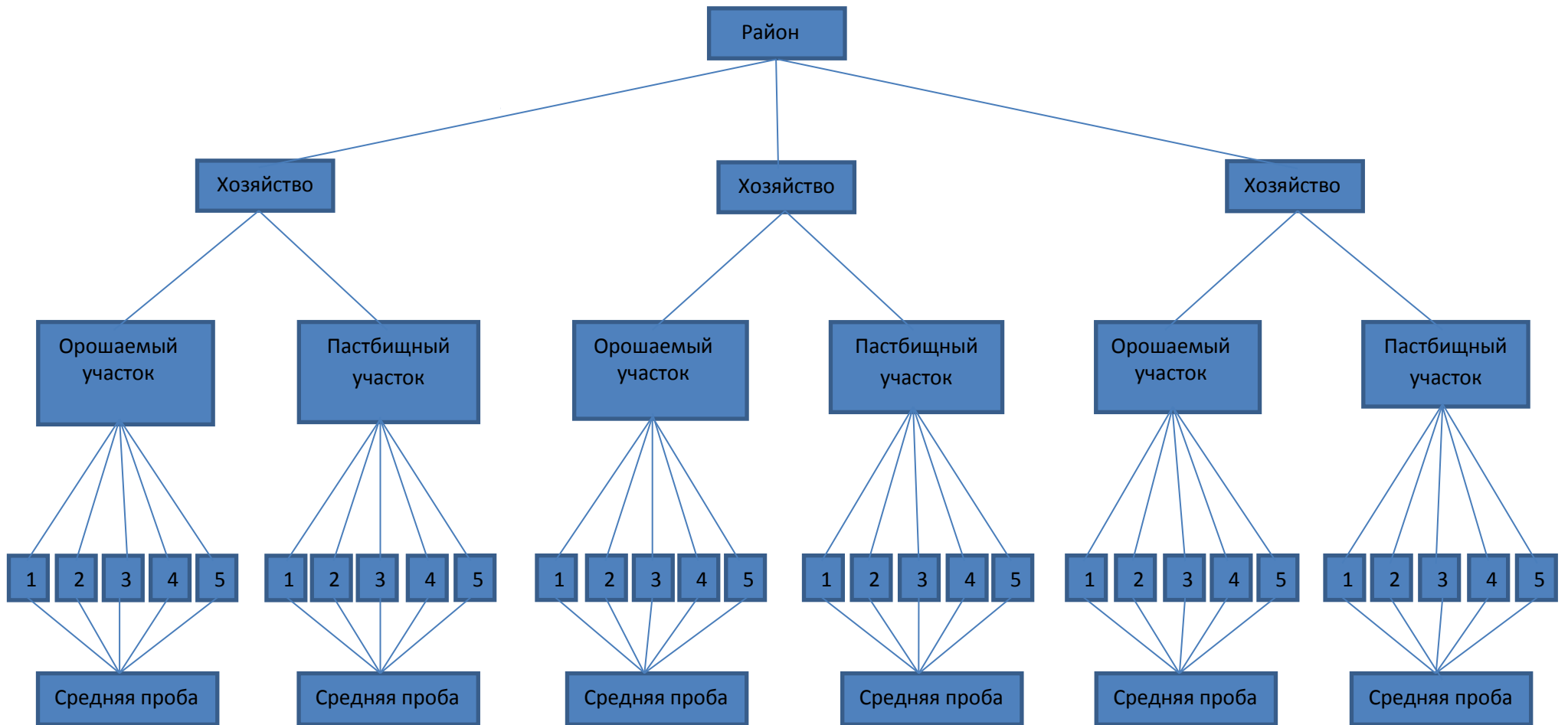
К бактериям слизистых оболочек глаз, относят *C. xerosis*, который при ослабленном организме, может быть причиной длительно и вяло протекающих конъюнктивитов. *C. diphtheriae* – возбудитель дифтерии человека, может стать причиной заболевания глаз. (Крылова М.Д., 1976., Barksdale L, 1981). Полагают, что данный вид инфицирует лошадей и крупный рогатый скот.

Данные, о возможности вызывать воспалительные процессы в слуховом канале, в месте обитания *C. pseudodiphtheriticum*, найти в литературе нам не удалось. Имеется сообщение, о случае эндокардита, вызванного *C. xerosis*. (Lipsky V.A., Goldenberger A.C., Topkins K. S., Plorde J.J. 1982).

Причиной различных воспалительных процессов у мышей и крыс, является *C. kutsheri*. (Bergey's manual of determinative bacteriology, - 8 ед. 1974).

Таким образом, результаты собственных исследований, и многочисленные данные отечественных и зарубежных источников, свидетельствуют о значительном распространении данных таксонов, как в объектах внешней среды, так и в организме животных.

Схема исследования почвы.



### 2.3.3. Методы выделения

К сожалению, недостаточная изученность, а также разбросанность малочисленной противоречивой информации о судьбе коринебактерий в природе не позволяют сформулировать научно-обоснованную методику обнаружения и идентификации, а также определить их место в биосфере. Вместе с тем, всесторонний анализ фактического материала и результаты собственных исследований, дают основания изложить узкий набор доступных методов, позволяющих быстро и просто определить диагноз таксона.

Для обнаружения коринебактерий исследуют кровь животных, кусочки органов, секреты (слюна, носоглоточные и влагалищные выделения, молоко); экскреты (моча, фекалий), а также различные объекты внешней среды (почва, вода, корма) и т.д. Отобранный материал по возможности доставляют в лабораторию в короткие сроки, в противном случае сохраняют в холодильнике при 4°C (или на льду), в течение 1-2 суток. Допускается хранения материала консервированного в 50% глицерине, в течение нескольких недель. При необходимости длительного хранения, замораживают при  $t$  15° – 20°C. (Отбор и подготовка материала см. приложение). Необходимо отметить, что эффективность лабораторных методов выделения коринебактерий, во многом зависит от качества отбора, обработки и хранения материала.

**Бактериоскопический метод.** Наиболее используемой дифференциальной окраской для коринебактерий является окраска по Грамму. На фиксированный мазок накладывают кусочек фильтровальной бумаги и наливают карболовый раствор генцианвиолета на 2-3 мин. Краситель сливают, и не смывая, наливают на 1-2 мин. раствор Люголя (йода кристаллического -1,0; йодистого калия как растворителя йода -2,0; дистиллированной воды – 300 мл). Смывают раствор Люголя и прополаскивают препарат в 95% спирте в течение 30 сек., пока не перестанет

отходить краситель. Промывают водой. Дополнительно окрашивают разведенным фуксином в течение 1 мин. Сливают краситель, препарат промывают и высушивают.

В окрашенных мазках коринебактерии обнаруживаются в виде грамположительных, палочковидных, прямых, слабоискривленных, или клюшкообразных палочек, размером от 0,3 – 0,6 до 1,0 – 8,0 мкм. Обнаруживаются V-образные, слабо ветвящиеся формы. Культуры особенно старые, легко теряют окраску, поэтому в поле зрения могут находиться палочки, составные части которых окрашены в разные цвета – явление метохромазии.

Часто в лабораторной практике, для идентификации коринебактерий, особенно *C. diphtheriae* и *pseudodiphtheriae* (Hoffmani), прибегают к окраске по Нейссеру и Леффлеру.

*Краска Нейссера:* 1. Метиленовый синий 0,1 гр., 95% спирт 2 мл, ледяная уксусная кислота 5 мл, дистиллированная вода 100 мл; 2. Раствор хризоидина, везувина или Бисмарка коричневого красителя 1 гр., дистиллированная вода 300 мл. Фиксированный и высушенный препарат выдерживают по 1 мин. в растворе метиленового синего и Люголя. Промывают водой, докрасивают раствором хризоидина (или везувина, Бисмарка) 1-3 мин. Промывают водой. Тело коринебактерий окрашивается в нежно-желтый цвет, зерно валютина (Бабеша-Эрнста) – в темно-синий.

*Окраска по Леффлеру:* Предусматривает обработку протравой препарата, перед окраской, для усиления действия. Но прежде исследуемую культуру, которая должна быть не старше 12-18 часов, осторожно петлей вносят в пробирку с несколькими миллилитрами водопроводной воды. Повторяют это 2-3 раза, до получения тонкой слегка ополесцирующей взвеси, дают постоять 15-20 мин. в термостате, для равномерного распределения микробов в воде. Затем петлей переносят каплю на покровное стекло, и если стекло чистое, капля принимает правильную круглую форму, легко расплывается и быстро высыхает без подогревания.

За 1-2 сут. до употребления готовят протраву, состоящую из 1 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина, 10 мл. 20% водного раствора танина, 5,5 мл. насыщенного на холоду, водного раствора сульфата закисного аммиачного железа (соль Моро), перед употреблением фильтруют. Препарат, приготовленный на покровном стекле, фиксируют, и помешают на часовое стекло. Наливают протраву, и 30-50 сек. подогревают до отхождения паров. Дав стеклу остыть, его промывают водой и, поместив на другое часовое стекло, красят фуксином Циля 2-3 мин, при слабом подогревании. После тщательной промывки и высушивания препарат готов для микрокопирования.

Коринебактерии обнаруживаются в виде темно-синих палочек на синем фоне.

Следует, отметить, что бактериоскопический метод имеет сравнительно слабую чувствительность. Положительные результаты удается получить при наличии в 1гр (мл) исследуемого материала свыше 100 тыс. микроорганизмов. Поэтому отрицательные результаты первичных исследований, не являются гарантом отсутствия коринебактерии в исследуемом материале. В этой связи, в рамках бактериоскопии, рекомендуется параллельное использование люминесцентного метода исследования, разрешающая способность которой находится на порядок выше, обычной световой микроскопии. Принцип основан на способности коринебактерии к свечению различными цветами, после обработки их флюоресцирующими веществами (флюорохромами).

Флюорохромирование зерен валютина проводят корифосфином: Готовят разведением 2 мл. основного раствора корифосфина в дистиллированной воде (1:1000), добавляют 6 мл уксусной кислоты и доводят объем дистиллированной водой до 500 мл. Фиксированный метиловым спиртом, в течение 8 сек. препарат промывают водой и высушивают. Наливают на 10 мин. рабочий раствор корифосфина, сливают, вновь промывают водой и высушивают на воздухе. Коринебактерии

окрашиваются в светящийся желто-зеленый цвет, а зерна валютина в оранжево-красный.

Микроскопический метод используется для определения морфологии и структурных особенностей бактерий, и дает предварительную ориентацию в начальном этапе выделения коринебактерий. Наличие большого количества близкородственных, углеводородокисляющих таксонов, ограничивают возможности данного метода.

***Бактериологический (культуральный) метод.*** Позволяет, обнаружить в исследуемом материале коринебактерий, для дальнейшей идентификаций и определения пределов биохимической активности, а также биологических и антигенных свойств. Метод имеет сравнительно высокую чувствительность, позволяющий получить положительные результаты, при наличии нескольких десятков коринебактерии в 1 гр. (мл) исследуемого материала.

***Питательные среды:*** *Кровяной агар.* К расплавленному и охлажденному до 45-50°C питательному агару добавляют 5-10% дефибринированной или цельной крови животного (крупного рогатого скота барана, кролика) или отходы человеческой крови (предварительно проверяют на стерильность, посевом на сахарный бульон, и ставят в термостат на 20 часов). Агар с кровью перемешивают, избегая образования пены, и разливают по чашкам.

*Кровяно-теллуритовый агар.* Приготовление теллурита калия ( $K_2TeO_3$ ). 2 гр. порошкообразного теллурита калия, добавляют в 100 мл. дистиллированной воды, стерелизуют нагреванием 30 мин. на кипящей бане и хранят при комнатной температуре. В случае выпадения осадка, раствор прогревают до полного растворения.

К 100 мл. растопленного и охлажденного до 45-50°C питательного агара (рН 7,6-7,8), добавляют 10 мл. дефибринированной (или гемолизированной) крови лошади или быка и 2 мл. 2% раствора теллурита калия. Тщательно размешивают и разливают в чашки Петри. Перед употреблением чашки подсушивают 15-20 мин. в термостате. Среду можно готовить и с сухой

кровью (на 100 мл. агара 15 мл. сухой крови), и на сухом питательном агаре или агаре Д (7,5 г на 1000 мл. дистиллированной воды или бульона Хоттингера).

На этой среде коринебактерии растут в виде колонии черно-грязного цвета (восстановление металлического теллурита). Колонии выпуклые, влажные, встречаются мелкие серого цвета с коричневым центром.

*Сухая хинозольная среда Бучина.* Порошок добавляют к воде согласно прописи на этикетке, тщательно размешивают и нагревают на слабом огне до полного растворения агара. Среду кипятят в течение 2-3 минут, помешивая во избежание пригорания, до образования быстро оседающей пены. Охлаждают до 50°C, добавляют 5-15 мл стерильной дефибринированной крови, размешивают и разливают в чашки Петри. После застывания, подсушивают в термостате, используют в течение 3-4 суток. Хранят в холодильнике.

Коринебактерий растут в течение 24-48 часов в виде плоских синих колонии, диаметром 0,5-1,5 мм, при этом среда приобретает фиолетовый цвет. Часто наблюдается рост дрожжеподобных грибов, колонии которых отличаются голубовато-белым цветом.

*Среда Клауберга II:* Расплавляют 100 мл. 3% питательного агара (7,5 г. сухого питательного агара, или агара Д, на 100 мл. дистиллированной воды), добавляют 3 мл. 2% раствора теллурита калия, 10 мл. глицериновой смеси и 50 мл. лаковой крови. Разливают в чашки Петри, хранят при 4-10 °С, не более 3-4 суток.

Лаковую кровь готовят добавлением 15 мл. дефибринированной крови любого животного к 34 мл стерильной дистиллированной воды.

Глицериновую смесь – 20 мл. химически чистого стерильного глицерина (стерилизуют при t 110°C в течение 30 мин.), к 40 мл. дефибринированной крови. Хранят в холодильнике в течение 3-6 недель.

*Среда Пай:* К взбитым яйцам – 1л., добавляют дистиллированную воду в количестве 500 мл, хорошо смешивают, фильтруют через двойной слой марли, добавляют глицерин – 120 мл, декстрозу – 5 гр., смешивают,

разливают в стерильные пробирки, стерилизуют в наклонном положении, как свернутую сыворотку.

*Цистин – теллурит – сывороточная среда Тинсдаля-Садыковой:* К 100 мл. агара, изготовленного на бульоне, добавляют: 12 мл. 1% раствора цистина (растворяют в 0,1N растворе хлористоводородной или серной кислоте), 12 мл. 0,1N раствора едкого натра для нейтрализации кислоты (подтитровать), 1,8 мл. 2% раствора теллурита калия, 1,8 мл. 2,5% раствора гипосульфита натрия, 15-20 мл. нормальной лошадиной или бычьей сыворотки. После каждого ингредиента, среду тщательно смешивают, разливают в чашки Петри и хранят не более 3-4 суток при комнатной температуре.

Коринебактерий растут в виде черных или темно коричневых колонии.

*Сывороточный агар:* К расплавленному и охлажденному до 45 – 50 °С питательному агару рН 7,6 добавляют 10-15% лошадиной или бычьей стерильной сыворотки, тщательно перемешивают, избегая образования пены, разливают в чашки Петри или пробирки. Агар в пробирках сразу скашивают и укладывают в наклонном положении.

*Синтетическая среда Сотона:* Аспарагина 4г, глицерина 60мл, лимонной кислоты 2г, двуосновного фосфата калия( $K_2HPO_4$ ) 0,5г, сульфата магния 0,5, цитрата аммиачного железа 0,05г, стерильной дистиллированной воды до 1000мл. Разливают в стерильные пробирки и колбы, стерилизуют в автоклаве, доведя давление до 0,1 атм. и тут же выключив подогрев. К среде добавляют n-алканы, 2% к количеству среды.

Известно, что, изолирование микроорганизмов для дальнейшего изучения во многом зависит от качества используемых питательных сред. Зачастую выбор сред или их ингредиентов обуславливается возможностями лаборатории, учитывая при этом доступность и дешевизну, пренебрегая ростовыми и ингибирующими для посторонней микрофлоры свойствами. К тому же, большинство предлагаемых сред недостаточно стандартизированы по диагностическим свойствам.



Из предложенных сред, для выделения коринебактерий, далеко не все нашли практическое применение.

Нитритный агар по Виноградскому, Накопительная среда (с активной подачей воздуха, аквариумным компрессором, через фильтр Зейтца), показывают слабые ростовые свойства, на фоне низких ингибирующих свойств. Культивирование коринебактерий в этих средах, добавлением в качестве источника углеводорода n-алканов (октан, ундекан, тетрадекан, гексадекан, гептадекан), в течение 17 дней не показали ожидаемого результата.

Сухая питательная среда на основе аминокептида, характеризующаяся высокой степенью стандартности и полноценным аминокислотным составом имеет хорошие ростовые и ингибиторные свойства, в частности для *S. diphtheriae* (Маргулис И. Л., Головина Н.М., Раскин Б.М., Мельникова В.А., Бочкова В.А., 1988;) Рост дифтерийных микробов на данной среде по данным авторов отмечен при посеве культуры в разведении  $10^{-6}$  (100 микробных клеток), через 24 часа. За этот период колонии достигали в диаметре 1-1,3 мкм. Кроме того, эта среда обладала выраженными ингибиторными свойствами в отношении стафилококка.

Представляет интерес комплексная среда для выделения *S. bovis*, на основе питательного бульона -8,0 г. и 5,0г. NaCl на 1 литр дистиллированной воды (pH -7,0) (Skerman T.M., Jayne – Willims D. J., 1966). Все штаммы *S. bovis*, нуждаются в ненасыщенных жирных кислотах с длинной цепью (пальмитиновой, рицинолевой, олеиновой). Это потребность эффективно восполняется 0,1%-ным твином -80.

Хорошими ростовыми свойствами, по мнению авторов (Mueller J.H., 1938), обладает специальная среда. Для приготовления, 40г кровяного агара, суспендируют в 1 литре дистиллированной воды, доводят до кипения, автоклавируют, охлаждают и к еще не застывшей смеси добавляют с соблюдением правил асептики, 5%-ную стерильную дефибринированную кровь. К 1 литру среды добавляют 10 гр. янтарной кислоты. (pH среды -7,0-7,4.).

Состав кровяного агара: 500 гр. экстракта сердечной мышцы КРС, 10 гр. триптозы, 5 гр. хлористого натрия, 15 гр. агара Дифко.

Сложные органические среды СМ-6, ВК -, К, и синтетическая среда AGN, обеспечивают (Тропино В. И., Сухорево-Немокова Н.Н., 1982), высокую трансформационную активность и накопление значительного количества биомассы.

Предложенная синтетическая среда (Skerman T.M., Jayne – Willims D. J., 1966), для культивирования коринебактерии, состоящая из солевых компонентов, микроэлементов, аминокислот, пуринов и пирамидинов, витаминов и твина 80, всего – 56 наименований, представляет трудности при изготовлений, виду сложности состава.

## **2.4. Сенсibiliзирующие свойства к туберкулину**

### **2.4.1 Разработка аллергена, изучение его специфичности и чувствительности в лабораторных и производственных условиях**

В практике аллергических исследований на туберкулез, известны многочисленные случаи, когда у реагирующих на ППД - туберкулин крупного рогатого скота, патологоанатомическими и бактериологическими методами исследования обнаружить туберкулёз не удастся и причина сенсibiliзаций остается невыясненной.

Установлено, что основной причиной проявления реакций на туберкулин у здоровых животных является сенсibiliзация атипичными микобактериями, имеющими общие антигены с возбудителем туберкулёза[91,102,103,152,154]

Кроме того, причиной сенсibiliзаций макроорганизма к туберкулину могут быть нокардий и родококки, имеющие общие родоспецифические данные с микобактериями[190,196,198].

Огромный интерес в этой связи представляют коринебактерии, характерными с микобактериями общими физико-химическими и биологическими свойствами и широко распространённые в

природе[18,19,22,37,179,180,181,315]. Имеются сообщения[314,325] о том, что заражённые коринебактериями животные реагируют на ППД-туберкулин для млекопитающих.

Многообразие причин, способствующих сенсбилизаций животных к туберкулину затрудняет дифференциальную диагностику туберкулёза, что в конечном итоге оборачивается значительным экономическим ущербом для хозяйств.

Указанное явление вызывает необходимость определения специфичности аллергии, результаты которых могут привести к повышению эффективности аллергического метода при диагностике туберкулёза животных.

Аллергическую диагностику туберкулёза крупного рогатого скота проводят с использованием ППД – туберкулин для млекопитающих. Для получения *M.bovis*, (штамм №8) выращивают на среде Сотона, в течение 2-х месяцев [34]. Дифференциацию сенсбилизаций вызванной птичьим видом микобактерий проводят симультанно с использованием очищенного туберкулина для птиц (*M.avium*, штамм №2282) и ППД - туберкулина для млекопитающих, по интенсивности реакций определяют характер сенсбилизаций.

Аллергены получены из нокардий и родококков [190,191,193,198], которые в составе комплексного аллергена повышают эффективность симультанной пробы с ППД - туберкулином при дифференциаций неспецифических реакций. Кроме того, аллергены из *N.asteroides* и *R. bronchialis* используется для аллергической диагностики нокардиоза и родококковой инфекций. Недостатком данного аллергена является низкая эффективность в симультанной пробе в случаях сенсбилизации крупного рогатого скота другими микобактериоподобными микроорганизмами, в частности коринебактериями.

Учитывая такое положение, предполагали что, расширив антигенную структуру комплексного аллергена из атипичных микобактерий

дополнительным внесением коринебактериозного сенситина, удастся повысить чувствительность и специфичность аллергена, а в конечном итоге повысить эффективность симультанной пробы.

Культуру коринебактерий (*Corynebacterium xerosis* N1911), выращивали на синтетической среде Сотона с добавлением смеси индивидуальных n- алканов содержанием в цепи от 10 до 17 атомов углерода, в течение 2-х месяцев [48]. Следует, отметить, что среда Сотона нами была модифицирована и сравнительно испытана ранее. Результаты испытаний показали большую эффективность этого варианта для выращивания коринебактерий, биомасса которых превышало таковые контрольных серий более чем в 2 раза, что позволило получить два раза больше активного белка к единицы объема. Колбы с культурой, где толщина слоя бакмассы достигал около 1см, автоклавировали при 1,5 атм. в течение 30 мин. Отделяли бактериальную массу фильтрацией и центрифугированием, после чего проводили осаждение белка. Из объёма супернатанта в количестве 1,5 литров осаждением в изоэлектрической точке NaCl (18% -концентраций, при 4,1 PH) получили 3,2 гр. белка. Осадок промыли, высушили, расфасовали в стеклянные флаконы и хранили, в холодильнике.

Испытуемые концентрации белка (0,00005; 0,0001; 0,0002; 0,0003; 0,0004 и 0,0005 мг в 0,1 мл), получали, разбавлением 0,01мл (0,001гр) раствора 10% концентраций в стерильном физиологическом растворе (1:1000). После перемешивания, по 0,1 мл раствора вносили поочерёдно в пробирки с физиологическим раствором (9,9; 4,9; 2,9; 2,4; 1,9 и 19,9 мл), таким образом, разведение, 1:100, 1:50, 1:30, 1:25, 1:20, и 1:200 соответственно.

Чувствительность аллергена проверяли на 24 морских свинках и (4-находились на контроле), через 25 дней после подкожного заражения их коринебактериями. Животных заражали влажной культуры в дозе 10 мг в 1 мл физиологического раствора. Титрацию доз аллергена проводили путем внутрикожного введения 0,1 мл раствора с различным содержанием белка на депилированный участок боковой ребрёрной поверхности. Реакцию оценивали

через 32 часа после введения. Интенсивность реакций определяли по диаметру папулы (в мм<sup>2</sup>), вычисляли площадь, усреднённую величину интенсивности реакций на определённую концентрацию белка. Полученные результаты представлены в таблице 19.

Таблица 19

Зависимость интенсивности реакций на аллергены от концентраций белка

Концентрация белка в аллергене (мг в 0,1 мл)	(Corynebacterium xerosis N1911),	
	Интенсивность реакций мм <sup>2</sup>	М ± m
0,00005	---- 1,8 --- ---	0,45 ± 0,45
0,0001	6,3 --- 12,4 ---	4,68 ± 2,97
0,0002	21,6 30,4 28,2 33,4	28,40 ± 2,50
0,0003	90,3 72,4 87,2 83,1	83,25 ± 3,91
0,0004	86,3 60,5 64,8 71,2	70,70 ± 5,60
0,0005	70,7 50,3 64,2 58,4	60,90 ± 4,34

Как видно из таблицы 19 на концентрации белка 0,00005 и 0,0001 мг реакции были выражены у одной морской свинки с интенсивностью 1,8мм<sup>2</sup>; – 6,3 и 12,4 мм<sup>2</sup> соответственно. На концентрации белка 0,0002; 0,0003; 0,0004 и 0,0005мг реагировали все подопытные животные, хотя не

установлено прямая зависимость реакций от содержания белка в аллергене Морские свинки контрольной группы на аллергены не реагировали.

Таким образом, установлено пороговая чувствительность аллергена в пределах 0,00005 мг в 0,1 мл раствора, которая повышается до концентраций 0,0003 мг и в дальнейшем независимо от увеличения, интенсивность реакций снижается. Поэтому за единицу белка коринебактерий была принята нами доза – 0,0003 мг в 0,1 мл раствора [41,54].

В широкой ветеринарной практике известен комплексный аллерген из атипичных микобактерий КАМ (*M.scrofulaceum* №12-С и *M.intracellulare* №13-Н). [268]. Для получения культуру выращивают на синтетической среде Сотона, белок осаждают трихлоруксусной кислотой и переосаждают серноокислым аммонием. В дальнейшем для удаления солей, проводят диализ через целлофановую оболочку против обессоленной воды. Содержание единиц (ЕД.), в растворе белка каждого вида, определяют на заражённых гамологичными микобактериями морских свинок в сравнении с препаратами известной активности. Полученные таким образом моноаллергены смешивают в равных количествах по содержанию единиц. Несмотря на выраженные дифференцирующие свойства в сравнении с ППД-туберкулином для птиц, КАМ имеет и существенный недостаток. Эффективность его зависит от степени родства микобактерий, вызвавших сенсibilизацию [187,188,267,268,270,].

Предложенный нами аллерген готовили исходя из содержания белка в КАМ-е - 1350 единиц действия в 0,2 мл. раствора и 0,0003мг белка коринебактерий в 0,1 мл, которая была нами принята за единицу. Для этого брали 20,25 мг влажной культуры *Corynebacterium xerosis* и смешивали с 10 мл КАМ-а. Для получения рабочего раствора, содержанием 15 единиц действия в 0,1 мл на морскую свинку, 0,2мл (1350ед), растворяли в 8,8 мл физраствора (1:45). Патент на изобретение №2409387 «Комплексный аллерген для дифференциации аллергических реакций на ППД-туберкулин для млекопитающих» 20 января 2011г.

Аллерген испытывали на морских свинках через 27 дней после их заражения микобактериями (*scrofulaceum* и БЦЖ) и коринебактериями (*xerosis*). Каждой культурой в политесте были заражены по 7 морских свинок и 7 служили контролем [42,45,51].

Опытным морским свинкам на депилированный участок реберной поверхности вводили испытуемый аллерген с одной стороны и КАМ с другой в дозе 0,1 мл (10 ед.). Результаты реакций учитывали через 24 часа после введения аллергенов, что отражены в таблице 20.

Таблица 20

Результаты оценки реакции морских свинок на аллерген

№	Вид заражаемой культуры	Кол-во животных в опыте	Интенсивность реакций в мм <sup>2</sup> на			
			Комплексный аллерген	М ± m	КАМ	М ± m
1	<i>Corynebacterium xerosis</i>	1	97,36	71,03 ±12,88	-	53,23 ±10,86
		2	-		64,22	
		3	72,16		85,13	
		4	88,19		46,09	
		5	63,24		77,45	
		6	100,19		62,57	
		7	76,17		37,18	
2	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	1	87,64	60,46 ±13,98	89,17	69,11 ±11,60
		2	64,28		34,20	
		3	-		107,17	
		4	100,15		26,24	
		5	90,83		77,42	
		6	43,16		92,30	
		7	37,19		57,26	
3	<i>Mycobacterium БЦЖ</i>	1	98,69	56,92 ±11,85	34,18	61,40 ±13,56
		2	37,34		92,30	
		3	66,70		67,24	
		4	55,10		106,30	
		5	-		26,17	
		6	76,48		87,49	
		7	64,12		16,12	

4	Контроль	1	-	-	-	-
		2	-			
		3	-			
		4	-			
		5	-			
		6	-			
		7	-			

Как видно из таблицы 20, наибольшая интенсивность реакций на аллерген была выражена у морских свинок заражённых коринебактериями (71,03мм<sup>2</sup>). Реакция же на КАМ выражалась значительно слабее.

В остальных группах морские свинки на аллерген реагировали менее интенсивно, чем на КАМ.

Наши данные свидетельствуют о том, что комплексный аллерген с содержанием коринебактериозного сенситина по чувствительности превосходит КАМ.

Производственное испытание аллергена проводили в хозяйстве, где среди коров и нетелей разного возраста постоянно выявлялись реагирующие на туберкулин животные, однако результаты симультанной пробы с КАМ оставались неопределёнными.

В симультанной пробе с испытуемым аллергеном исследовали 14 положительно реагирующих на туберкулин животных. При этом положительно реагировало (реакция интенсивнее на ППД-туберкулин) одно животное, отрицательно (реакция на испытуемый аллерген интенсивнее) – 12 голов. Количество реагирующих в равной степени составило одно животное. Следовательно, различие в интенсивности реакций на туберкулин и на испытуемый аллерген достоверно и результаты симультанной пробы считаются определёнными. Поэтому с уверенностью можно констатировать, что животные данного хозяйства, у которых длительное время результаты симультанной пробы с КАМ оставались неопределёнными, сенсibilизированы неспецифически.



Таким образом, применение КАМ с коринебактериозным аллергеном в симультанной пробе, показало высокую эффективность предложенного нами метода при дифференциации неспецифических реакций на туберкулин.

#### **2.4.2. Динамика аллергических реакций на туберкулин у зараженных коринебактериями животных**

Успехи, достигнутые в последние годы в микробиологии, расширили наше представление о микроорганизмах, в связи с чем возникает необходимость пересмотра роли некоторых из них, в частности микроорганизмов, имеющих близкое родство с микобактериями. Имеющиеся в настоящее время данные о коринебактериях позволяют констатировать их близкое родство с микобактериями и рассматривать как объект сенсibilизации макроорганизма к туберкулину [10,45,49,154,162,183,196,232,237,254,].

Широкое распространение коринебактерий в природе [18,19,22,29,180,181,182], общие физико-химические и биологические свойства их с микобактериями, все больше появляющиеся сообщения о возможной сенсibilизации ими макроорганизма, требуют детального изучения их в целях определения специфичности аллергии.

Исследование проводили на 36 морских свинок. В работе использованы культуры музейных штаммов БЦЖ, *Mycobacterium avium*, *Corinebacterium xerosis* N1911, *C. ulcerans* N675, *C. bovis*. Каждой культурой подкожно заражали по 6 морских свинок. В области лопатки с левой стороны, введением 10 мг влажной культуры в 1 мл физиологического раствора. ППД-туберкулин для млекопитающих вводили внутримышечно в дозе 25 мг в объеме 0,1 мл.

В комплекс исследований использовали: аллергическую пробу, реакции розеткообразования (РОК), бласттрансформации лейкоцитов (РБТЛ), специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ) и торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ).

Специфическим аллергеном служил коринебактериозный белок, полученный в лабораторных условиях из *Corynebacterium xerosis* N1911.

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики, с использованием программы, Б-01, «Корреляция», где определена достоверность разницы между средними двух независимых и зависимых выборок [49].

Перед заражением морские свинки были исследованы аллергической пробой с ППД - туберкулином для млекопитающих с целью исключения естественного заражения туберкулезом. Через месяц после заражения пробу с ППД-туберкулином повторяли, а последующие исследования (через 60 и 90 дней) провели симультанно с использованием ППД-туберкулина для млекопитающих и коринебактериозного аллергена. Результаты приведены в таблице 21.

Динамика проявления аллергических реакций на туберкулин и коринебактериозный сенситин у экспериментально зараженных животных

№ гр.	Вид заражаемой культуры	Интенсивность реакций через:				
		30 дней	60 дней		90 дней	
		туберкулин	туберкулин	Коринебактериозный сенситин	туберкулин	Коринебактериозный сенситин
1	2	3	4	5	6	7
1	БЦЖ	145,3±35,6	125,1±37,6	133,1±18,5	176,3±85,6	36,6(-)
2	<i>M. avium</i>	112,5±36,5	154,3±47,2	136,7±29,8	137,2(-)	-
3	<i>C. xerosis</i> №1911	167,4±76,2	76,3(-)	65,7±29,2	-	63,5±16,6
4	<i>C. ulcerans</i> №675	76,7±16,8	64,5±43,8	85,8±20,6	72,4±27,3	37,8±6,3
5	<i>C. bovis</i>	57,9±12,4	61,2±16,4	-	76,4±20,3	92,3±17,7
6	Контроль	-	-	-	-	-

Условные обозначения: (-) – еденично реагировали.

Исследования показали, что зараженные коринебактериями морские свинки реагируют на туберкулин, причем реакции держались до конца срока наблюдения (90 дней). Вместе с тем, обнаружена реакция животных зараженных микобактериями на коринебактериозный сенситин. Длительность реакций на коринебактериозный сенситин у зараженных микобактериями БЦЖ *M. avium* сохранились до 60-ти дней, а через 90 дней только у отдельных животных.

Изучение в динамике относительного содержания Т- и В – резеткообразующих клеток показало, что в ответ на воздействия любого из использованных антигенов обе системы иммунитета отвечают повышением продукции данных клеток, по сравнению с животными контрольной группы и в сравнении с исходными показателями. У морских свинок зараженных микобактериями (1-я и 2-я группа), наблюдалась увеличение обоих классов клеток в динамике, если не считать резкий скачок вверх количество В-лимфоцитов в 2-ом этапе исследований. В остальных группах (у животных зараженных коринебактериями) обнаруживали снижение количество Т-лимфоцитов в 3-ом этапе исследований и В-лимфоцитов после 60 дней содержания (таблица 22).

Об иммунобиологическом состоянии организма морских свинок, зараженных микобактериями и коринебактериями, позволяют судить и результаты реакций бласттрансформации лимфоцитов, которые являются одними из наиболее используемыми, при определении клеточного и гуморального иммунитета. Для стимуляции лимфоцитов в РБТЛ использовали специфический стимулятор ППД-туберкулин для млекопитающих в дозе 60мкг/мл.

У всех опытных животных было обнаружено бластообразование в сравнении с контролем. В первых 2-х группах (БЦЖ, *M. avium*) процент бластов динамично повышалось до 90 дней (срок наблюдения), тогда как в остальных группах наибольший процент трансформации лимфоцитов в бласты отмечали

через 2 месяца с момента сенсibilизации, и заметно снижалась к 3-месяцу (таблица 23).

Таблица 22

Содержание Т- и В- лимфоцитов в периферической крови морских свинок через 30,60,90 дней после заражения

№ п.н	Вид заражаемой культуры	Относительное содержание Т- и В- розеткообразующих клеток (в%)							
		Исходное		1-ое исследование		2-ое исследование		3-ое исследование	
		Т	В	Т	В	Т	В	Т	В
1	БЦЖ	19,7±1,6	32,6±3,4	21,6±1,6	40,6±2,3	26,7±5,4	60,5±1,6	25,8±5,6	36,5±6,4
2	<i>M. avium</i>	22,3±3,4	27,7±5,6	23,7±2,4	38,4±3,2	23,9±3,6	70,4±4,3	22,7±2,3	40,8±3,3
3	<i>C. xerosis</i> №1911	21,9±2,1	30,2±1,9	26,5±3,7	54,8±6,4	29,7±6,4	40,6±2,8	28,8±6,4	35,6±2,8
4	<i>C. ulcerans</i> №675	20,8±3,4	29,7±4,6	22,6±2,7	46±7,4	25,4±3,2	39,4±1,8	19,4±2,3	43,5±6,4
5	<i>C. bovis</i>	21,5±2,7	30,7±2,4	22,7±1,6	48±2,3	28,7±2,9	41,7±3,3	30,6±4,5	37,5±2,8
6	Контроль	21,0±1,3	30,8±1,9	20,1±1,6	29,6±2,5	19,9±5,6	28,7±3,7	20,6±1,7	31,2±2,3

Таблица 23

Показатели тестов клеточного иммунитета у зараженных микобактериями и коринебактериями морских свинок через 30, 60 и 90 дней.

№ Гр.	Вид заражаемой культуры	Показатели иммунных реакций (в %)								
		РБТЛ			РСЛЛ			РТМЛ		
		1-исслед	2-исслед	3-исслед	1-исслед	2-исслед	3-исслед	1-исслед	2-исслед	3-исслед
1	БЦЖ	12,3±0,3	13,4±0,6	16,4±0,8	17,8±1,6	19,7±1,5	18,9±0,6	34,3±2,4	32,4±1,6	37,6±1,7
2	<i>M. avium</i>	10,6±0,7	9,7±0,5	12,4±0,2	15,6±1,1	17,2±3,4	17,1±2,7	42,6±3,8	36,5±7,2	30,5±2,8
3	<i>C. xerosis</i> №1911	6,4±0,07	7,8±0,06	6,3±0,08	13,4±0,5	13,8±0,5	14,1±0,7	55,7±6,5	52,4±1,4	58,6±2,1
4	<i>C. ulcerans</i> №675	4,5±0,04	6,5±0,09	6,1±0,03	14,9±1,6	16,6±0,6	15,5±0,7	63,9±4,7	48,9±3,4	50,1±1,8
5	<i>C. bovis</i>	5,7±0,02	6,3±0,03	5,8±0,06	12,7±2,6	14,4±2,2	14,3±2,6	68,6±6,4	67,5±1,3	50,7±12,4
6	Контроль	1,6±0,01	1,5±0,2	1,5±0,09	5,4±0,6	6,1±1,0	5,9±0,9	68,7±6,4	76,4±5,7	72,3±6,9

Закономерное повышение процента лизиса лимфоцитов получили в реакции специфического лизиса лимфоцитов (РСЛЛ). Заметное увеличение количества лизируемых клеток наблюдались к 2 месяцу заражения в сравнении с контролем, в дальнейшем до конца срока наблюдения (90 дней) существенных изменений не произошли. Наиболее высокий процент лизиса был отмечен у животных первых двух групп (БЦЖ, *M. avium*).

Состояние клеточного иммунитета в ответ на действие коринебактериозного антигена в сравнении с микобактериями изучали и в реакции торможения миграций лимфоцитов (РТМЛ). Торможение миграции наблюдалось у животных всех групп, причем в 2-первых группах процент торможения высокий, чем в других. Существенной разницы в торможении миграций лимфоцитов в зависимости от срока исследования не наблюдалось.

Следует, отметить, что результаты, полученные нами в иммунологических тестах с гомологичными заражению антигенами, были резко позитивными. В то же время наблюдали перекрестные реакции этими же антигенами у животных, инфицированных гетерологичными антигенами, но на более низком уровне.

Состояние клеточного иммунитета выявленная в реакциях (РБТЛ, РСЛЛ, РОК и РТМЛ) с использованием специфического туберкулезного антигена показывает близость антигенной структуры между коринебактериями и микобактериями.

Полученные данные показывают возможность сенсibilизации макроорганизма к туберкулину коринебактериями, что может быть, использовано для решения проблемы неспецифических реакций.



## **2.5. Аллергическая диагностика коринебактериоза и ассоциативных с ним инфекций.**

В ветеринарной практике диагностика коринебактериоза и ассоциативных с коринебактериями инфекций, проводят патологоанатомическим и бактериологическим методами. Исследуют молоко, мокроту, навоз, мочу, при отрицательных результатах проводят диагностический убой и в случае обнаружения патологоанатомических изменений свойственных коринебактериозным инфекциям, уточняют диагноз. В сомнительных случаях для подтверждения диагноза берут кусочки паренхиматозных органов для бактериологического исследования. Для диагностики некоторых хронически протекающих заболеваний (туберкулеза, бруцеллеза, туляремии и др.) применяют аллергическую пробу, основанную на феномене гиперчувствительности замедленного типа. На введение аллергена гомологично сенсibilизированный макроорганизм реагирует увеличением кожной складки, что является показателем инфицированности организма (67, 143, 145, 151, 160, 167, 168, 175, 204, 217, 253, 261, 262, 263, 277,). Для диагностики инфекций коринебактериозной этиологии, которые имеют группоспецифическую общность с микобактериями, подобный метод не предусмотрен по причине отсутствия аллергена.

На внутрикожное введение туберкулина сенсibilизированный коринебактериями макроорганизм отвечает слабо выраженной неспецифической реакцией.

Недостатком данного метода является; низкая чувствительность и непродолжительность реакции на туберкулин у зараженных коринебактериями животных. При этом причина неспецифических реакции остается невыясненной, что заметно сказывается на эффективности применяемых мер при ликвидации данной инфекций. Бактериологические и патологоанатомические исследования коринебактериозных инфекции не только трудоемки, но и требуют немалых материальных вложений.

Целью наших исследований является повышение эффективности и упрощение прижизненной диагностики коринебактериозных инфекции. Для чего в способе диагностики коринебактериозных инфекции в качестве диагностикума использовали коринебактериозный аллерген, который вводился внутрикожно в верхней средней трети шеи крупного рогатого скота в дозе 0,2 мл. с учетом и оценкой реакции через 72 часа. Используемый в качестве диагностикума аллерген более специфичен и чувствителен. Реагирующим считают животных с увеличением кожной складки на месте введения аллергена с разницей в 3 и более мм. по сравнению с толщиной неизменной кожи.

Для экспериментальной проверки изготовили аллерген из коринебактерий. Испытание разных доз (0,1-0,4 мл) проводили на морских свинках, сенсibilизированных коринебактериями (*C. xerosis* N1911), через 27 дней после подкожного заражения в дозе 10 мг влажной культуры в 1 мл физиологического раствора. Под опытом находились 25 морских свинок (по 5 голов на испытываемую дозу) и 5 служили контролем. Испытуемые дозы аллергена вводили опытными животными на депилированный участок реберной поверхности. Учет и оценку реакции проводили через 48 и 72 часа после введения аллергена. Реагирующим считали животных, у которых обнаруживали разницу в толщине кожной складки в месте введения аллергена, в сравнении с таковой неизменной кожи, не менее 2 мм. Результаты отражены в патенте №2592372 (М.О.Баратов 2016г).

По результатам проведенных исследований на дозу 0,1 мл реагировали все опытные морские свинки со средней интенсивностью реакции через 48 часов – на  $3,31 \pm 0,84$  , и 72 часа -  $3,82 \pm 0,97$  . На дозу 0,2 мл интенсивность реакций составляло  $4,16 \pm 1,04$  и  $4,84 \pm 1,21$  соответственно. С увеличением доз аллергена не установили разницы в сторону повышения интенсивности реакции, поэтому оптимальной дозой аллергена для использования в целях диагностики коринебактериозных инфекции была принята доза в объеме 0,2 мл. Следует сказать, подведение концентрации белка в аллергенах к

количественному содержанию его в туберкулине (0,7мг/мл) имело решающее значение в определении оптимальной дозы в объемном выражении (таблица 24).

Таблица 24

Результаты испытания разных доз аллергена на сенсibilизированных коринебактериями морских свинок.

Дозы аллергена (в мл)	Интенсивность реакции в (мм)			
	Через 48 часов	M±m	Через 72 часа	M±m
0,1	- 4,16 3,95 4,74 3,68	3,31±0,84	- 4,94 4,30 4,63 5,23	3,82±0,97
0,2	5,33 4,91 5,13 - 5,44	4,16±1,04	6,36 6,02 5,94 - 5,87	4,84±1,21
0,3	- 4,72 5,02 4,18 4,03	3,59±0,92	- 5,77 5,01 4,19 4,07	3,81±1,00
0,4	3,23 4,87 3,17 4,18 -	3,09±0,83	4,66 3,03 - 5,17 -	2,57±1,11

Испытание аллергена на специфичность проводили на зараженных коринебактериями и атипичными микобактериями морских свинок и на больных туберкулезом животных (таблица 25).

Таблица 25

Результаты испытания аллергена на специфичность

Группы животных	Число	Кол-во реагирующих	%	Интенсивность реакций
Зараженные коринебактериями (C. xerosis N1911),	15	14	93,3	6,92±0,28
Зараженные атипичными микобактериями (M.scrofulaceum №12-С )	15	12	80	4,76±0,33
Больные туберкулезом	6	3	50	4,95±0,38

Как видно из таблицы 25 исследование показали высокую специфичность аллергена. Сенсибилизированные животные реагировали с большей интенсивностью на гомологичный аллерген. Так, интенсивность реакции у зараженных коринебактериями морских свинок составляло 6,92±0,28, тогда как у зараженных атипичными микобактериями и больных туберкулезом животных - 4,76±0,33 и 4,95±0,38 соответственно.

Следует подытожить, что микобактерии имеют родственные антигенные детерминанты с коринебактериями, поэтому данная группа животных реагировала на коринебактериозный аллерген, но в значительно меньшем количестве и с меньшей реакцией.

Используемый в качестве диагностикума аллерген оказался более специфическим и чувствительным, что позволяет предотвратить неоправданный убой животных, а также расходы на проведение дальнейших исследований для уточнения диагноза.

## **2.6. Разработка методов культивирования коринебактерий**

### **2.6.1. Сравнительное изучение питательных сред**

Бактериологическая диагностика является наиболее достоверной при диагностике инфекционных болезней, результаты которой во многом зависят от качества применяемых питательных сред.

Накопленные научные и практические данные по лабораторному выявлению коринебактерий не позволяют определить элективную питательную среду, поэтому нами сравнительному изучению подвергнуты наиболее часто используемые питательные среды для культивирования коринебактерий. Результаты отражены в статье (М.О. Баратов 2007).

1. Нитритный агар по Виноградскому, с добавлением 2% н-алканов (Гексадекан  $C_{16}H_{34}$ ), которые при оценке некоторых авторов (О.А. Нестеренко, Е.И. Квасникова, Т.М. Ногина) 1985г, является наилучший для выделения родококков.

2. Синтетическая среда Сотона, с добавлением 2%-ой смеси углеводов, Октан ( $C_8H_{18}$ ), Ундекан ( $C_{11}H_{24}$ ), Тетрадекан ( $C_{14}H_{30}$ ), Гексадекан ( $C_{16}H_{34}$ ).

3. Накопительная среда с добавлением смеси н-алканов в количестве 2%(Октан, Ундекан, Тетрадекан, Гексадекан).

4. Кровяной агар с добавлением – 10% цельной свежезятой крови крупного рогатого скота.

5.Кровяной теллуритовый агар с 10% дефибринированной кровью лошади.

6.Сухая хинозольная среда Бучина (производства НПО « Питательные среды» г. Махачкала).

7.Сывороточный агар, с 10% -ой бычьей стерильной сывороткой.

Оценку сред проводили, посевом тест-штаммов и свежевыделенных культур коринебактерий. В качестве музейных штаммов использовали *Corynebacterium xerosis* N1911, и *Corynebacterium ulcerans* N675, а нативным материалом служили эпизоотические штаммы, выделенные из объектов внешней среды (почва, корма, навоз и кровь крупного рогатого скота).

Каждый штамм высевали в 12 чашек (колбы) каждой среды, из расчета содержания 500 клеток в 0,1мл. Оценку давали по скорости и интенсивности роста колоний, их величине и ингибирующим свойствам. Результаты 2-х кратных повторений опыта учитывали через 24 и 48 часов ( таблица 26 ).

Таблица 26

Результаты испытание питательных сред для выделения коринебактерии.

Среды	Показатель прорастания колоний в(++++)				Величина колоний в мм. через 48 часов
	24часа		48часов		
	Тест штаммы	Нативный материал	Тест штаммы	Нативный материал	

1.Нитритный агар	—	—	—	—	—
2.Среда Сотоно	—	—	—	±	—
3.Накопительная среда	—	—	—	—	—
4.Кровяной агар	+++	+++	++++	++++	1,5–2,5
5.Кровяной-теллуритовый агар	+++	+++	++++	++++	2,2–3,4
6.Среда Бучина	++	++	++	+++	2,5–3,3
7.Сывороточный агар	++	+++	+++	++++	2,1–3,0

Примечание: +++++ - Сплошной рост. Колоний не поддаются подсчету  
+++ - Обильный рост (от 30 до 56 колоний)  
++ - Умеренный рост (от 16 до 33 колоний)  
+ - Скудный рост (от 5 до 8 колоний)

Материалы таблицы 26 показывают, что рост колоний на среде Бучина наблюдался впервые сутки на фоне отсутствия сопутствующей микрофлоры из-за высокой ингибирующей активности данной среды.

По ростовым свойствам кровяной и кровяно-теллуритовые агары не уступали среде Бучина, но рост колоний формировался на фоне низких ингибирующих свойств по отношению к сопутствующей микрофлоре

Низкими дифференцирующими свойствами обладал сывороточный агар, где рост на вторые сутки подавлялся банальной микрофлорой

Самый низкий выход был на жидких синтетических средах.

Таким образом, среда Бучина показала практическую значимость и диагностическую эффективность по изученным свойствам, что может быть, рекомендована для культивирования коринебактерий как наилучшая

## 2.6.2. Совершенствование питательной среды для изолирования коринебактерий

Питательная среда является основным гарантом качества бактериологического метода. Поэтому очень важно при выборе сред учитывать потребность микроорганизмов к питательным веществам необходимым для поддержания их жизнедеятельности. Предложено огромное количество питательных сред с широким диапазоном неорганических солей и мясных гидролизатов, приготовленных зачастую с нарушением баланса между составными частями без учета ростовых свойств, использование которых вносят в лабораторную работу неконтролируемые факторы. Для нормального развития микроорганизмам нужны микро- и макроэлементы, которые участвуют в образовании коферментов, посредством которых белки, жиры и углеводы гидролизуются до более простых и растворимых соединений доступных для ассимиляции микробной клеткой. Неорганические соединения входят в состав микробной клетки, цитоплазмы и создают необходимые для микроорганизмов физико-химические условия в питательной среде.

Из большого количества питательных сред предложенных в практику для культивирования коринебактерий далеко не все нашли практическое применение. Слабые ростовые и низкие ингибирующие свойства, сложность в изготовлении, непрактичность в применении, низкая высеваемость и тд., не позволяют определить универсальную, доступную и эффективную питательную среду для их культивирования, поэтому для повышения результативности приходится пользоваться несколькими средами. В этой связи, задача по созданию универсальной, эффективной и в то же время простой и доступной питательной среды для культивирования коринебактерий является на сегодня актуальной проблемой. Поэтому нами взамен дистиллированной воде для обогащения среды микро и макроэлементами предложена геотермальная, как дополнительный источник ростовых свойств (М.О. Баратов 2016).

Среда Виноградского имеет существенные недостатки: Углеводороды из-за разных температурных параметров кипения, приходилось стерилизовать в



термостате по отдельности, что создает определенные трудности при их приготовлении. Кроме того, среда отличается слабыми ростовыми свойствами.

Кровяной агар имеет низкие ингибирующие свойства по отношению к сопутствующей микрофлоре.

Указанные недостатки относятся и к кровяно-теллуритовому агару, отличающееся от кровяного агара наличием 2мл 2% раствора теллурита калия ( $K_2TeO_3$ ).

Среда Клауберг II отличается сложностью в изготовлении и непрактичностью. К 100 мл 3% расплавленного питательного агара добавляют 3мл 2% раствора теллурита калия, 10мл глицериновой смеси и 50мл лаковой крови. Химически чистый глицерин, требуемый для приготовления глицериновой смеси, необходимо стерилизовать при 110°C в течение 30 минут. Изготовление среды осложняется еще и тем, что нужно предварительно приготовить лаковую кровь из дистиллированной воды и дефибринированной крови животного, что сопряжено с дополнительными расходами и временем. Видимые колонии на данной среде появляются не раньше 48 часов.

Сывороточный агар обладает низкими дифференцирующими свойствами.

Сухая хинозольная среда Бучина содержащая панкреатический гидролизат кильки - 30,6 г, натрия хлорид -  $5,0 \pm 0,05$  г, Д-глюкозу - 15,0 г, водный голубой - 0,25 г, натрий углекислый -  $0,4 \pm 0,05$  г, агар микробиологический -  $8,0 \pm 1,0$  г, ( $pH$   $7,4 \pm 0,2$ ), дистиллированную воду до 1 литра и 5% стерильную дефибринированную кровь человека или животных, непригодна для выделения возбудителя из объектов внешней среды (почва, корма, навоз, вода и тд.) и биоматериала (кровь, молоко, слизь и тд.), из-за низкой высеваемости. Кроме того, она содержит 2 вида минеральных солей, что, по нашему мнению недостаточно для качественного обеспечения коринебактерий необходимыми микро и макроэлементами [162,350].

Поэтому в целях расширения солевого состава среды предлагается заменить дистиллированную воду на геотермальную, с минерализацией 5,02 г/л,

что позволить качественно обеспечить среду минеральными солями, анионами и катионами что существенно повышает рост и высеваемость коринебактерий.

Расширенный лабораторный анализ геотермальной воды (фотометрия, потенциометрия, атомно-абсорбционная спектрометрия, комплексометрия и тд.) показал качественное и количественное отличие данной воды от дистиллированной по микро и макроэлементам. Суммарное значение составляла: анионов – 1,6771 г/л ( $\text{NH}_4$ , Na, K, Mg, Ca, Sr, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni), катионов – 3,4732г/л (Cl, Br, I,  $\text{SO}_4$ ,  $\text{HCO}_3$ ,  $\text{HPO}_4$ ,  $\text{NO}_3$ ). Кроме того, в геотермальной воде содержится нейтральные и кислые битумы (2,5 мг/л), гумусовые вещества (7,1 мг/л) как источник углеводов. Для углеводородокисляющих микроорганизмов, к которым относятся и коринебактерий, такой источник является стимулом повышения ростовых свойств предлагаемой среды, а также благоприятно влияет на размножение коринебактерий.

Среду готовили следующим образом: к 60 гр. сухой хинозольной среды Бучина добавили геотермальную воду, при этом общий объем среды довели до 1 литра, размешали, довели до кипения, кипятили в течение 2 минут до полного растворения агара и образования крупнопузырчатой быстро оседающей пены. После охлаждения до  $50^\circ\text{C}$  добавили 5% стерильной дефибрированной крови крупного рогатого скота. Тщательно размешивая, не допуская образование пены, разлили в чашки Петри. После застывания среду слегка подсушили в термостате при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 40-60 минут. Цвет готовой среды темно-синий. Хранили в холодильнике, использовали в течение 3-4 суток. Рост культуры наблюдали через 24-48 часов. На месте роста культуры среда окрасилась в фиолетовый цвет, а колонии в синий.

При экспериментальной проверке были испытаны среды, наиболее часто используемые для культивирования коринебактерий, которые готовились по прописи авторов.

Оценку сред проводили посевом тест-штаммов и свежевыделенных культур коринебактерий. В качестве музейного штамма использовали *Corynebacterium xerosis* N1911, *Corynebacterium ulcerans* N675, а нативным материалом служили лабораторные штаммы, выделенные из объектов внешней среды (почва, корма, навоз и кровь крупного рогатого скота).

Культуру каждого штамма высевали в 6 чашках Петри (колбы) каждой среды. Для соблюдения равнозначности опыта материал высевали равными дозами (500 клеток в 0,1 мл.). При учёте результатов провели сравнительный анализ эффективности сред изучаемых образцов с предлагаемым по скорости и интенсивности роста, по величине колоний и ингибирующим к сопутствующей микрофлоре свойствам. Результаты учитывали через 24 и 48 часов. Опыты повторялись двукратно. Результаты лабораторных исследований приведены в таблице 27.

Таблица 27

Характеристика роста коринебактерий на питательных средах

Среды	Показатель прорастания колоний в (++++)				а Величин колоний в мм. через 48 часов
	24часа		48часов		
	Тест штаммы	Нативный материал	Тест штаммы	Нативны й материал	
1.Нитритный агар	-	-	+	+	1,6-1,9
2.Среда Сотона	-	-	+	+	2,1-2,3
3.Клауберг II	-	+	+	++	1,0-2,4
4.Кровяной агар	+++	++++	++++	++++	1,5-2,5
5.Кровяной-теллуритовый агар	+++	+++	++++	++++	2,2-3,4

6. Сывороточный агар	+++	+++	++++	++++	2,1-3,0
7.Среда Бучина	+	++	++	+++	2,5-3,3
8.Предлагаемая среда	+++	++	+++	+++	2,7-3,5

Примечание: +++++ - Сплошной рост. Колоний не поддаются подсчету  
+++ - Обильный рост (от 20 до 46 колоний)  
++ - Умеренный рост (от 12 до 23 колоний)  
+ - Скучный рост (от 2 до 6 колоний)

Как видно из таблицы 27 рост на среде Бучина формировался первые сутки - от 2 до 6 колоний с тест-штаммами и умеренным ростом с нативным материалом - от 12 до 23 колоний. На вторые сутки количество колоний в чашках с нативным материалом увеличилось от 20 до 46 колоний.

Предлагаемая среда показала высокие дифференцирующие и ингибирующие свойства. Колонии появлялись на 1 сутки в количестве от 20 до 46 в чашках с тест штаммами и до 23 колонии с нативным материалом. На 2 сутки картина практически не изменилась, что является показателем высокой ингибирующей активности. Рост отличался не только числом, но и характером и размером колонии.

По ростовым свойствам кровяной и кровяно-теллуритовые агары не уступали среде Бучина, но рост колоний формировался на фоне низких ингибирующих свойств по отношению к сопутствующей микрофлоре.

Низкими дифференцирующими свойствами обладает и сывороточный агар, где обнаружили обильный рост сопутствующей микрофлоры на вторые сутки.

Эффективность нитритного агара и среды Сотона была самой низкой. Слегка заметное однородное помутнение обнаружили на средах через 48 часов.

Для сравнительного испытания модифицированной среды приготовили 3 варианта, которые отличались количественным содержанием вносимой геотермальной воды, взамен дистиллированной (таблица 28.)

Таблица 28

Состав среды с различным содержанием геотермальной воды

Состав среды	В 100мл среды	Варианты среды с различным содержанием геотермальной воды в %		
		65	85	100
Панкреатический гидролизат кильки	3,06	3,06	3,06	3,06
Натрия хлорид	0,5	0,5	0,5	0,5
Д-глюкоза	1,5	1,5	1,5	1,5
Водный голубой	0,025	0,025	0,025	0,025
Натрий углекислый	0,04	0,04	0,04	0,04
Агар микробиологический	0,8	0,8	0,8	0,8
Количество геотермальной воды вносимой взамен дистиллированной.	мл.	61,15	79,9	94,08
Количество соли в геотермальной воде.	гр.	0,30	0,39	0,47
Количество дистиллированной воды.	мл.	32,95	14,18	-
Общее количество соли в среде .	гр.	0,84	0,93	1,01

Общее содержание геотермальной воды в различных вариациях составляло 65, 85, и 100%, (61,15; 79,9 и 94,08 мл соответственно).

Посев *Corynebacterium xerosis* произвели в 10 чашках Петри каждого варианта. Результаты представлены в таблице 29.

Таблица 29

Сроки и характер появления роста на средах различных вариантов.

Варианты сред с различным содержанием геотермальной воды в %	Показатели прорастания колоний в (++++)	Corynebacterium xerosis	
		Число чашек Петри с ростом через... суток	
		24	48
65	++++	3	5
	++	2	3
	+	5	2
85	++++	2	3
	++	6	6
	+	2	1
100	+++	8	9
	++	2	1

Условные обозначения: «++++» - сплошной рост; «+++» - обильный рост; «++» = умеренный рост; «+» - скудный рост.

Как видно из таблицы 29 рост первичных колонии на всех вариантах сред отмечался через 24 часа. Однако в третьем варианте со 100% содержанием геотермальной воды количество чашек с обильным ростом заметно отличались, не происходило прорастание культуры в течение 48 часов, не менялись морфологические свойства колонии, а также их цвет.

В остальных сериях обнаружили чашки с ростом сплошным газоном, где колонии не поддавались подсчету, причем со временем количество таких чашек увеличивалось.

Таким образом, проведенные исследования показали, что среда, приготовленная на основе геотермальной воды, приводит к ускоренному росту коринебактерий на фоне высокой активности ингибирующей постороннюю микрофлору свойств, что в конечном итоге показывает значительную эффективность. Среда со стопроцентной заменой дистиллированной воды геотермальной показало значительную предпочтительность, поскольку по скорости, чистоте и массивности роста она намного превосходило остальные варианты. Кроме того, на изготовление среды не требуется ощутимых материальных затрат,

так как геотермальная вода в условиях Дагестана доступна для любой бактериологической лаборатории.

## **2.7. Распространение и видовой состав нокардий и родококков**

Основой профилактических мероприятий при туберкулезе остаётся диагностика. Одной из важных проблем диагностики на сегодня дифференциация неспецифических реакции на туберкулин, в том числе вызываемых микобактериоподобными микроорганизмами, нокардиями и родококками, которые по многочисленным данным, в том числе и по нашим, имеют широкое распространение, как в объектах внешней среды, так и в биоматериале.[18,23,198]. Изолируют их с помощью метода парафиновой приманки N Sohnden. [220] в модификации R.Gordon и W.Наqan [184]. Сущность, которого, заключается внесением небольшого количества материала в пробирку с питательной средой Sohngе, куда погружают стеклянную палочку покрытую парафином, далее, ставить в термостат при 37 °С и инкубируют в течение 2-х недель. Далее, выросшие колонии рассеивают на плотную питательную среду. После, изолируют колонии и высевают на свежие среды [18].

Имеются сообщения о том, что получены хорошие результаты методом накопительных культур на среде Мюнца с добавлением 2% индивидуальных алканов или жидкого парафина [293,329]. Также изолированные колонии культивировали на агаризованных питательных и яичных средах. Хорошо растут особенно культуры нокардии и на синтетической среде Сотона с n-алканами или жидким парафином.

Распространение нокардий и родококков изучали путем бактериологического исследования проб почвы пастбищных угодий и прифермских участков. Пробы в количестве (от 6 до 20) отбирали в разных участках на поверхности и с глубины 5-15 см.

Для исследования было отобрано 64 пробы почвы, с пастбищ и животноводческих угодий, во всех природно-климатических зонах республики. Помимо этого, были отобраны пробы навоза, кормов и воды из разных источников. Данные отражены в таблице 30.

Как видно из данных таблицы 30, из 290 проб выделено 156 культуры (77,25%): 125 – методом «парафиновой приманки»; 95 – на среде Мюнца с 2 % п-алканами и 44 – на нитритном агаре по Виноградскому.

Дифференцирующие признаки изолированных культур определяли с использованием узкого набора признаков: микобактерий идентифицировали по наличию свободной миколовой кислоты или липида LCN-A в этанол эфирных экстрактах. (F.Kanetsuna, A.Bartoli, 1972) нокардий и родококки – методом анаэробного усвоения глюкоза (тест Хью и Лефсона) а также по арилсульфатазной активности и чувствительности к мономицину.

По результатам проведённых исследований, свободная миколовая кислота (LCN-A) в клеточных гидролизатах выделенных культур обнаружить не удалось, что исключает наличия в исследуемой культуре микобактерий. По результатам остальных тестов, а именно по отсутствию липида LCN-A, наличию арилсульфатазной активности и чувствительности к мономицину, выделенные культуры были отнесены, 75 (43,65%) к нокардиям и 96 (56,34) к родококкам.



Таблица 30

## Объекты и количество проб исследованных на выделение нокардий и родококков

№ п/п	Наименование хозяйств	Пробы воды			зеле- ная масса	сено разнотра вное	со- ло- ма	се- наж	си- лос	поч ва	на- воз	Пробы		
		стоячих водое- мов	артезиа нский	речн ой								из корму шек	комбик орма	с пола
1	КФХ «Казмаульский»	-	-	-	3	-	-	-	2	3	4	3	3	-
2	СПК «Курушский»			1		1	1	2	6	2	11	10	6	2
3	СПК «Хамаматюртовский»	4	5		1	2		3	2	15	11	5	7	-
4	КФХ «Рассвет»						1		10	5	3	3	-	-
5	СПК Коркмасова		2	1	4			1		4	3	5	-	-
6	КФХ «Карабудагова»	2			3	3	3		4	5	4	6	-	3
7	КФХ «Красный Дагестан»			5	1	4	3	2		13	6	10	-	1
8	СПК «Героев СССР»	3		4		3	2			8	3	3	-	3
9	КФХ «Ленина»	4		-		2			2	3	5	4	2	3
Всего		13	7	11	12	16	10	8	26	58	50	49	18	12
Итого		290												

Данные по выделению нокардий и родококков из объектов внешней среды представлены в таблице 31.

Таблица 31

**Частота выделения нокардий и родококков из объектов внешней среды**

Пробы	Число	Количество выделяемых культур			
		нокардий	%	родококков	%
Вода стоячих водоемов	13	2	15,38	4	30,76
Вода артезианская	7	-	-	-	-
Вода речная	11	1	9,09	3	27,27
Зеленая масса	12	1	8,33	3	25,00
Сено разнотравное	16	1	6,25	6	37,5
Солома	10	-	-	3	30,0
Сенаж	8	-	-	2	25,00
Силос	26	2	7,69	6	23,07
Почва	58	44	75,86	23	39,65
Навоз	50	13	26,0	21	42,00
Пробы из кормушек	49	7	14,28	17	34,69
Комбикорм	18	2	11,11	6	33,33
Пробы с пола	12	2	16,66	2	16,66
Всего	290	75	25,86	96	33,10

Как видно из таблицы 31, выделено из объектов внешней среды 75 культур нокардий и 96 – родококков, преимущественно из почвы и навоза. Причем родококки изолировали из почвы, имеющую как кислую, так и

щелочную реакцию, были обнаружены также и в пробах, отобранных из солончаковой местности в плоскостной зоне находящихся на берегу Каспийского моря. Особено часто родококки выделяли из проб почвы отобранных из нефтеносных участков, из навоза, а также сена разнотравия и силоса.

Нокардии выделили из проб почвы, навоза, обнаружили в пробах из кормушек. Достаточно широкое распространение обнаруженных микроорганизмов в объектах внешней среды, объясняется неприхотливостью данных таксонов к факторам роста, способностью их выживать на скудных по питательным веществам объектах внешней среды. Выделяли из проб отобранных из хозяйств находящихся во всех почвенно-климатических зонах республики. Обнаружение этих микроорганизмов на нефтеносных участках, является показателем усвоение ими углеводов.

Учитывая близкородственные отношение указанных таксонов с микобактериями, представляет интерес изучение возможности циркуляции их в макроорганизме, в частности в организме реагирующих на туберкулин животных.

Для этого от реагирующих на туберкулин животных были отбраны 37 проб. Данные представлены в таблице 32.

Таблица 32

**Результаты исследования биоматериала от реагировавших на туберкулин животных**

№ п/п	Хозяйство	Район	Кол-во проб	Выделенные культуры			
				нокардий	%	родококков	%
1	СПК«Усишински»	Акушинский	7	1	14,28	3	42,85
2	СПК «Хуринский»	Лакский	4	-	-	3	75,00
3	КФХ «Ленина»	Лакский	10	1	10,00	2	20,00

4	СПК«Хамамаюртовский»	Бабаюртовский	10	3	30,00	1	10,00
5	КФХ «Рассвет»	Карабудахкентский	6	1	16,66	1	16,66
ВСЕГО:			37	6	16,21	10	27,02

Как видно из таблицы 32, из биоматериала выделено 16 культур (43,24%), в том числе: родококков –10 (27,02%) и нокардий – 6 (16,21%). Следует отметить, что во влагилищных выделениях (всего 8 проб) культуру родококков обнаружили в 1,2 раза больше, чем нокардий.

Идентификацию видов проводили по физиологическим, биохимическим и хемотаксономическим свойствам. Для чего, сначала из эпизоотических культур создали 10 различных подгрупп, по культурально-морфологическим и физиологическим свойствам. В качестве контроля использовали известные музейные тест - штаммы нокардий и родококков. На каждую изучаемую культуру оформляли паспорт (см. паспорт), куда вносили культурально-морфологические и физиологические свойства, при этом, руководствуясь и сопоставляя полученные данные с «Определителем микроорганизмов» по Берги, выпуск 9 и «Одобрёнными списками названий бактерии».

### Регистрационный паспорт

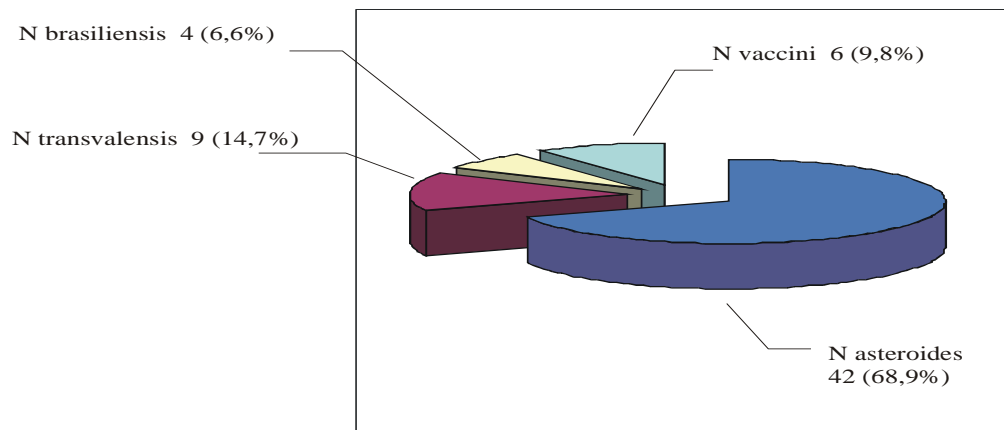
Вид	№	Источник выделения	
Окраска по Грму	Окраска поколений на: Сусло-агаре	желтые,	Колонии кожистые
Подвижность		лимонные	бактериеподобные
Кислотоустойчивость		телесные,	Обр азов арабинозы

Размер клеток на МПА, ПГА через 16 ч.	05-2 08-1 мк.		кремовые		ксилозы					
	3-4 мк.			розовые, красные, оранжевые			галактозы			
	6-8 мк.					желтые, лимонные			глюкозы	
	редко 15-19							телесные, кремовые		
	12-45 мк.			розовые, красные, оранжевые			рамнозы			
	чаще 20-25					розовые, красные, оранжевые			сорбозы	
Хорошо развит субстратный мицелий		желтые, лимонные		фруктозы						
Распад субстратного мицелия на кокковидные элементы			телесные, кремовые			лактозы				
Образование воздушного мицелия		розовые, красные, оранжевые			мальтозы					
Образование бурого пигмента на ПГА			розовые, красные, оранжевые			сахарозы				
		Колонии суспендируются			целлобиозы					
			хлопьями			раффинозы				
		равномерно			дульцита					
						инозита				
				маннита						
					сорбита					
				глицерина						
					салицина					
				α –метил-Д-глюкозида						
					Пептонизация молока					

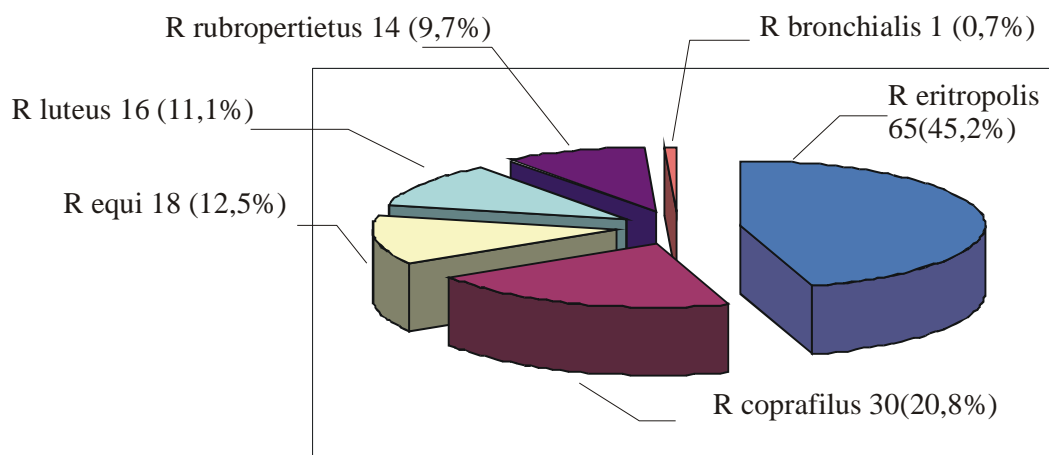
Усвоение Na-солей органич	бензойной	Рост на минераль	C6	Рост при	5 % NaCl
	винной				7 % NaCl

	лимонной		C7			37 <sup>j</sup>		
	молочной		C8			45 <sup>j</sup>		
	уксусной		C9		чувствительность к: лизозиму			
	пировиноградной		C10					
	щавелевой		C11		пенициллину			
	янтарной		C12		Наличие в клетках мезо-ДАПК, арабинозы и галактозы			
наличие:	уреазы		C13					
	каталазы		C14					
	желатиназы		C15		Тип липида LCN-A:	asteroides		
	нитратредуктазы		C16					
п – нитрофенолоксидазы			C17					
Гидролиз:	казеина		C18				rhodochrous	
	крахмала		C19					
	ксантина		C20			calcarea		
	тирозина		C23					
	клетчатки		C24					
Рост на	феноле		смесь C20-C29					
	декстрине							
Образование индиготина из индола								
Использование этана-пропана								

По результатам проведенных исследований удалось различить 4 вида нокардий и 5 – родококков, для наглядности количество выделенных культур, показали в виде рисунка 2 и 3.



**Рис. 2, Видовой и количественный состав изолятов нокардий.**



**Рис. 3 Видовой и количественный состав изолятов родококков.**

Как видно из рисунков 3 и 4, соотношение выделенных культур составило *N. asteroides* 42 (68,9 %) , *R. erithropolis* 65 (45,2 %). *R. coprofilus* обнаружили только в пробах навоза.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о значительном распространении нокардий и родококков в объектах внешней среды и в продуктах животного происхождения. Изолируемость указанных таксонов с большой частотой из проб кормов и навоза, свидетельствуют о заражении ими животных в основном через желудочно-кишечный тракт. Изученные свойства нокардий и родококков показывают наличие у них общих родоспецифических свойств с микобактериями, что еще раз доказывает необходимость определения видового состава микроорганизмов при дифференциации неспецифических реакции на туберкулин.

### **2.7.1. Разработка аллергенов из нокардий и родококков.**

Одной из важных проблем при диагностике туберкулеза внутрикожной туберкулиновой пробой остаётся проблема неспецифических реакций на туберкулин. Выявление из года в год массовых неспецифических реакции на туберкулин создает серьезную проблему в обнаружении туберкулеза.

В связи с чем поиск перспективных направлений для дальнейшего изучения этиологии и механизмов возникновения неспецифических реакций на туберкулин и усовершенствование методов диагностики, является необходимостью продиктованной складывающейся на сегодняшний день ситуацией. Одним из таких направлений является создание моноспецифических аллергенов на основе микобактериоподобных (углеводородокисляющих) микроорганизмов.



С учетом выше изложенного, нами из культуральной жидкости *N. asteroides* и *R. bronchiales* получен активный белок и испытан в лабораторных условиях (кроликах) и на производстве, на коровах оставшихся в группах с неопределенными реакциями на туберкулин, в симультанной пробе с КАМом. В данном разделе изложены результаты научных исследований, опубликованные в статье (Р.А. Нуратинов., М.О. Баратов 2001).

Для чего культуры нокардий и родококков выращивали на усовершенствованной нами синтетической среде Сотона с добавлением 2% парафина, культивировали в термостате при температуре 37С в течение 2-х месяцев. Используемая (усовершенствованная) среда позволяет получить больше бактериальной массы по сравнению с исходной средой. По результатам культивирования удалось получить бактериальную массу культуры *R. bronchialis* толщиной в 1 см. В дальнейшем для разрушения бактериальной клетки и выхода белковой массы, колбы с культурой автоклавировали при 1,5 атм. в течение 30 минут, затем фильтрацией через фильтры Зейтца отделяли бакмассу. Осаждение белка осуществляли хлористым натрием в 16% концентрации, после, для очищения от соли фильтрат перегоняли через целофановые оболочки против обессоленной воды. В результате из 1,4 литров влажной массы белка, путем высушивания и лиофилизации получили нокардий – 6,5 гр и родококки – 9,4 гр.

Для получения испытуемых концентрации, из осаждённого белка готовили маточный раствор 10% концентрации, а затем - испытуемые концентрации: 0,00001; 0,0002; 0,0003; 0,0004; 0,0005 и 0,0006 мг в 1 см<sup>3</sup>.

Испытание проводили на 60 морских свинках зараженных *N. asteroides* (ВКМ Ас 1077)- 20 голов, *R. bronchialis* (ИМВ Ас 737)-20 голов и контролем служили – 8. На каждую испытуемую концентрацию белка брали по 6 морских свинок. Заражали лабораторных животных введением 10 мг влажной культуры внутривенно на депилированный участок реберной

поверхности. Через 27 дней после заражения проводили испытание сенситинов, для чего были определены подгруппы, для проведения поли – и моно тестов, сенситины вводили в дозах 0,1 см<sup>3</sup>. Оценивали реакцию через 24 часа, учитывая при этом частоту и интенсивность реакций, которого измеряли кутиметром в мм<sup>2</sup> по диаметру папулы (гиперемированный участок), определяли средние параметры интенсивности реакций на изучаемую концентрацию белка в группах с учетом погрешностей, также достоверность различий в интенсивности реакций по таблице определения достоверности. Данные представлены в таблице 33.

Таблица 33

Показатели интенсивности реакций на сенситины от концентрации белка

Концентрация белка в сенситине (мг в 0,1 мл.)	Вид культуры				
	N.asteroides		R.bronchialis		
	Интенсив ность	M±m	Интенсив ность	M±m	Контроль
0,00001	- - - - -	-	- - - - -	-	-
0,0002	- - - - -	-	- - - - -	-	-
0,0003	25,2 35,4 75,4 16,5 -	33,0±13,0	- 47,1 83,4 78,6 -	43,7±18,9	-
0,0004	13,7 12,6 30,1 24,2	35,9±13,1	47,1 47,2 79,6 41,1	50,0±9,3	-

	83,4		20,6		
0,0005	99,7 16,5 75,4 73,2 126,5	82,6±18,7	67,7 30,1 53,6 41,1 30,1	47,6±7,2	-
0,0006	29,4 73,4 53,6 47,1 75,4	59,5±8,6	41,1 48,6 20,6 35,4 47,3	41,7±5,1	-

По результатам проведенных исследований, таблица 33, обнаружили, на дозы 0,00001 и 0,0002 морские свинки не реагировали; на дозу 0,0003 – не реагировала одна морская свинка зараженная - *N.asteroides* и две зараженные - *R.bronchialis*, остальные все реагировали. На концентрацию 0,0004; 0,0005; 0,0006 реагировали все морские свинки во всех группах. Не удалось выявить зависимость интенсивности реакции от увеличения концентрации белка. Средняя интенсивность реакций у зараженных *N.asteroides* составляла: на концентрацию белка 0,0005 -  $82,6 \pm 18,7 \text{ мм}^2$ , у *R.bronchialis*. 0,0004 –  $50,0 \pm 9,3 \text{ мм}^2$ ., полученные результаты были подтверждены методом вариационной статистики при обработке материала ( $p < 30$ )[102], что показано в таблице 34.

Таблица 34

Показатели достоверности интенсивности реакций в зависимости от концентрации белка

Сравнение испытанных концентраций белка в сенситине	<i>N.asteroides</i>		<i>R.bronchialis</i>	
	t эксперим.	t крит.	t эксперим.	t крит
0,0003 и 0,0004	0,14	1,207	0,2	1,206

0,0003 и 0,0005	1,15	1,209	0,17	1,209
0,0003 и 0,0006	1,59	1,209	0,9	1,209
0,0004 и 0,0005	2,34	1,209	0,5	1,209
0,0004 и 0,0006	0,6	1,209	0,64	1,209
0,0005 и 0,0006	0,9	1,209	0,63	1,209

Как видно из таблицы 34, обнаружить достоверность различий в зависимости от концентрации белка и интенсивностью полученных реакций нам не удалось, полученные результаты тому свидетельство,  $t$  экспериментальное практически во всех случаях был меньше  $t$  критического. (2,306). По результатам проведенных исследований выявлена пороговая чувствительности сенситинов нокардии и родококков, которая находится в пределах 0,0001 и 0,0002 мг в 0,1 см<sup>3</sup> раствора. Интенсивность реакции увеличивается до концентрации белка 0,0003 мг, в дальнейшем интенсивность реакции не зависело от увеличения концентрации белка. Поэтому за единицу белка нокардии была принята доза 0,0005мг в 0,1 см<sup>2</sup> раствора, а родококков - 0,0004мг в 0,1 см<sup>2</sup>. Таким образом, проведенные исследования позволили определить единицу белка нокардий и родококков в 0,1 см<sup>2</sup> раствора, которые будут использованы в дальнейших работах.

### **2.7.2. Сенсibiliзирующие свойства к туберкулину**

Лабораторное испытание сенситинов провели на зараженных тест-штаммами микобактерий, нокардий и родококков, кроликах. На каждую заражаемую культуру брали по 5 кроликов (всего 40 голов) 5 служили контролем, 10 мкг влажной культуры в физиологическом растворе, вводили

подкожно на депилированный участок брюшной поверхности. Аллергические реакции изучали 3-х кратным исследованием через каждые 30 дней. Результаты приведены в таблице 35.

По результатам проведенных исследований, таблица 35, обнаружили, что все подопытные кролики реагировали: заражённые микобактериями с высокой интенсивностью на ППД – туберкулин для млекопитающих, чем на нокардин. Зараженные нокардиями на накардин и с меньшей на туберкулин. У отдельных особей реакция к *M. scrofulaceum* сохранилась на всем протяжении опыта.

Испытания родококкового сенситина провели по аналогии с нокардиозным аллергеном. Результаты приведены в таблице 36.

Динамика аллергических реакций на ППД-туберкулин для млекопитающих  
и нокардиозный сенситин у экспериментально зараженных кроликов

№ п/п	Вид заражаемой культуры	Интенсивность реакции (в мм <sup>2</sup> ) при исследовании через ..... дней					
		30		60		90	
		ППД- туберкулин	нокардин	ППД- туберкулин	нокардин	ППД- туберкулин	нокардин
1	М. БЦЖ	171,7±14,4	101,5±57,5	193,5±78,5	187,1±62,5	215,0±0	-
2	M. avium	114,7±92,7	134,3±56,7	345,0±0	253,5±91,5	-	-
3	M. scrofulaceum	157,3±52,4	110,3±41,3	65,0±0	-	137,0±0	90,0±0
4	N. asteroides	100,0±0	196,0±53,1	-	219,0±56,0	100,0±0	62,0±0
5	N. transvalensis	110,0±10,0	135,0±7,7	166,0±0	150,0±0	75,0±0	-
6	R. equi	150,0±0	-	-	50,0±0	-	208,0±97,7
7	R. bronchialis	-	-	-	67,0±11,3	-	-
8	Контроль	-	-	-	-	-	-

Таблица 36

Динамика аллергических реакций на ППД-туберкулин для млекопитающих  
и родококковый сенситин у экспериментально зараженных кроликов

№ п/п	Вид заражаемой культуры	Интенсивность реакции (в мм <sup>2</sup> ) при исследовании через ..... дней					
		30		60		90	
		на ППД-туберкулин	сенситин родококков	на ППД-туберкулин	сенситин родококков	на ППД-туберкулин	сенситин родококков
1	М. БЦЖ	162,5± 11,5	71,3±10,4	187,2±54,3	94,2±12,0	134,6±22,5	-
2	M. scrofulaceum	124,4±22,2	84,2±9,5	170,1±24,8	54,0±0,1	91,5±34,4	42,4±3,4
3	N. asteroides	75,5±14,4	86,5±22,4	-	31,3±0,1	-	-
4	N. brasiliensis	56,2±8,5	41,3±0,1	72,5±14,0	-	-	-
5	R. bronchialis	87,6±14,2	119,2±22,3	93,5±13,1	213,0±35,2	-	112,5±32,3
6	R. equi	45,4±0	76,6±23,4	99,8±13,4	174,1±24,5	-	94,6±0
7	Контроль	-	-	-	-	-	-

По результатам проведенных исследований, таблица 36, обнаружили, что все подопытные животные на первом этапе исследования (через 30 дней) реагировали на туберкулин, на третьем этапе исследования на родококковый сенситин реагировали зараженные микобактериями и родококками с разной интенсивностью. Зараженные нокардиями на третьем этапе исследования на аллергены не реагировали. Зараженные кролики реагировали интенсивнее на гомологичный аллерген, нежели на гетерологичный.

Производственные испытания аллергенов из нокардий и родококков в политесте провели на коровах и нетелях СПК «Рассвет» Лакского района (равнинная зона), где контрольно-комиссионными исследованиями выявляются постоянно значительное количество реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих, животных. Для постановки аллергической пробы было отобрано 50 разновозрастных животных, по 25 голов на изучаемый аллерген. По результатам исследования выявили: общее количество реагирующих на ППД-туберкулин в первой группе - 18 голов, из которых 9 животных, с высокой интенсивностью реагировало и на нокардиозный аллерген. Во второй группе количество реагирующих на туберкулин - 16, на родококковый аллерген - 7. Средняя интенсивность реакции на ППД - туберкулин для млекопитающих составляла  $6,8 \pm 0,9$ , нокардин -  $5,6 \pm 0,7$ , на родококковый аллерген -  $3,7 \pm 1,2$  мм

Из проведенных исследований следует, что углеводородокисляющие (микобактериоподобные) микроорганизмы в частности нокардии и родококки имеют общие родоспецифические данные с микобактериями, что было отражено в перекрестных аллергических реакциях с ППД-туберкулином для млекопитающих и нокардиозным и родококковым аллергенами. Интенсивность реакций всегда была больше ( $P < 0,05$ ) на гомологичный заражению аллерген, чем на гетерологичный.



## **2.8. Совершенствование метода дифференциаций аллергических реакций на туберкулин**

### **2.8.1. Дифференциация микобактериоподобных микроорганизмов и их идентификация**

Установление принадлежности изолированной культуры к коринебактериям продиктовано, возможностью данных таксонов сенсibilизировать макроорганизм к туберкулину.

Общие культурально-морфологические, хемотоксономические, физиологические, биохимические и генетические свойства, ставят род *Corynebacterium* в один ряд с микобактериями, а также с нокардиями и родококками, сенсibilизирующая к туберкулину способность которых показана в многочисленных работах (Лазовская А.Л., Блохина И.Н., 1976; Лазовская А.Л. и др., 1994; Awad F.Y., 1958; Awad E.Y. et.al., 1963), (таблицы 37,38,39).

Вместе с тем, более чем в 40% случаях, от животных с положительной симультанной пробой с КАМ, бактериологическими исследованиями не удается выделить микобактерии, и причина сенсibilизации остается не выясненной.

В этой связи, разработка простых и доступных методов для детальной классификации коринебактерий, основанного на результатах физиологических и биохимических тестов, является актуальной задачей.

***Дифференцирующие признаки:*** Наиболее эффективным дифференцирующим признаком является определения этанол-эфирных экстрактах липида LCN-A (свободная миколовая кислота), с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ). По наличию липида LCN-A, коринебактерий, нокардий и родококки, дифференцируются от микобактерий, поскольку у последних отсутствует нерастворимый в метаноле липид.

Предложенный метод сравнительно легкий в исполнении, не требующий больших материальных затрат. Он состоит из 3 этапов: получения бакмассы, её подготовки и тонкослойной хроматографии на силикагеле [31,35,40].

Сущность метода в следующем: полученную на среде Сотона бактериальную массу, промывали два раза дистиллированной водой (при 4000 об/мин), высушивали при 37<sup>0</sup>С в течение суток. Далее, отобрали 400 мг и измельчили в ступке, заливали 4 см<sup>3</sup>. смеси 96<sup>0</sup>этилового спирта и серного эфира (соотношение 1:1). Пробирки периодически встряхивали в течение суток, при этом дважды меняли экстракционную жикость, а затем фильтровали. Далее фильтровали бумажными фильтрами, экстракты высушивали при 34<sup>0</sup>С, в течение 20-24 ч, разводили бензолом из расчета 0,3 см<sup>3</sup>. на 400мг исходной бакмассы, после чего на точку «старта» в пластинке на расстоянии 1,5 см наносили 0,01 см<sup>3</sup>.раствора. Предварительно на пластинке отмечали высоту подъема растворителя (13,5см). В процессе, пластинку вынимали дважды, переворачивали и высушивали в вытяжном шкафу в течение 20 мин. Таким образом, пластинку обрабатывали два раза, после чего погружали в растворитель на глубину не более 0,5 см.

Исследования показали, что наилучшее разделение пятен липида происходили в системе, состоящей из гексана, эфира (по 50 см<sup>3</sup>. и ледяной уксусной кислоты (2см<sup>3</sup>), которых выявляли обработкой пластинки 10% спиртовым раствором, фосфорно-молибденовой кислоты). Липиды движутся с фронтом растворителя по пластинке, а липид LCN-A не растворим в метаноле и остается на месте. Если в процессе культивирования пятна не обнаруживали, пластинки погружали в сосуд с метанолом, затем высушивали при комнатной температуре в течение 2-3 мин, и опрыскивали фосфорно-молибденовой кислотой, после чего для проявления ставят в сушильный шкаф при температуре 105<sup>0</sup>С в течение 10-12мин.

Довольно стабильный дифференцирующий признак для коринебактерий – окисление глюкозы в аэробных условиях, определяли на нейтральной (рН-7,0) среде, состоящей из компонентов: пептона-5,5, дрожжевого экстракта-0,5,

глюкозы, бромкрезолпурпура-0,02, агара-1,2 и воды дистиллированной-500см<sup>3</sup>. Готовые пробирки стерилизовали при 125<sup>0</sup>С в течение 20 мин. Затем, пропаривали перед посевом в течение 10-15 мин. и ставили в холодную воду для затвердения. Для посева петлю с культурой погружали до дна пробирки, после чего заливали стерильный парафин, толщиной промерно 25 мм, далее ставили в термостат при 37<sup>0</sup>С на 5 дней. В процессе культивирования, коринебактерии меняют цвет индикатора с малинового в желтый, что означает окисления глюкозы с образованием кислоты. Микобактерии и нокардии не окисляют глюкозу.

Характерным для коринебактерий признаком, дифференцирующим его от неспорообразующих, грамположительных, анаэробных палочек неправильной формы, является наличие фермента каталазы. Для её определения каплю, перекиси водорода (3%-ный раствор) наносили на предметное стекло и туда же вносили петлей исследуемую культуру. Присутствие каталазы, определяли образованием пузырьков водорода.

Таблица 37

### Основные морфо - функциональные и хемотаксономические признаки

#### Морфологические признаки

Признак	Corynebacterium	Mycobacterium
Морфология	Палочковидные, прямые, слабо искривленные, клюшкообразные, V-образные, слабо ветвящие.	Палочковидные, прямые или искривленные, иногда булабовидные, слабо ветвящие
Размер клетки ( мкм)	0,3 – 0,6 x 1,0 – 8,0	0,2 – 0,6 x 1,0 - 10
Подвижность	Неподвижны	Неподвижны
Окраска по Граму	Грамположительны, хотя <i>S. diphtheriae</i> , легко теряет окраску, особенно в старых культурах, т.е. явление метохромазии.	Окрашиваются слабо, рассматриваются как грамположительные

Устойчивость к кислотам, спиртам и щелочам.	Некислотоустойчивы	Кислото-спирто-щелочеустойчивы.
Наличие пилей	Иногда образуют, многочисленные пили	Не образуют
Спорообразование	Спор не образуют	Спор не образуют
Цикл развитие	Кокк-палочка кокк. Впервые 8 часов роста исходные клетки значительно удлиняются до 5-6 мкм, затем делятся на 2 дочерние. Происходит удлинение и деление клеток, в результате образуется V-формы. Формируется микроколонии, затем в центре наблюдается укорочение клеток, по краям интенсивный рост и деление палочковидных особей. К 20-24 часам, колонии состоят из ровных палочек.	В процессе роста, кокковидная клетка удлиняется, образуется перегородка, и дочерние клетки разъединяются простым способом. Далее рост замедляется, короткие палочковидные клетки с каждым делением укорачиваются и превращаются в кокковидные.
Форма колонии	Круглые, выпуклые, гладкие (редко шероховатые). Матовые или слегка блестящие, сероватые, беловато-кремовые, светло – желтые и желтые. <i>S. matrichotii</i> в аэробных условиях, образует шероховатые колонии трех типов: Круглые – с целными краями. Неправильной формы – с краями имеющими нитевидное обрамление. Неправильной формы – с цельными или нитчатыми краями.	Шероховатые( <i>M. tuberculosis</i> ), гладкие и прозрачные( <i>M. intracellulare</i> ), или промежуточные между этими типами( <i>M. kansasii</i> ). Многим видам свойственно образование более одного типа колонии

Образование токсина	Некоторые патогенные виды образуют экзотоксины, хотя не образуют растворимых гемолизинов, но на твердых средах содержащих кровь, возможен лизис.	Данные противоречивые
Отношение к кислороду	Аэробы и факультативные анаэробы, лучше растут в аэробных условиях, часто образуют поверхностную пленку	Факультативные аэробы
Образование каталазы	Каталазоположительны	Отношение в зависимости от медленно и быстрорастущих видов, разное
Воздушный мицелий	Не образуют	Иногда формируют первичные мицелии
Субстратный мицелий	Не формируют	Формируют иногда
Синтез миколовых кислот	Синтезируют	Синтезируют
Тип клеточной стенки	IV – тип, содержит мезо-ДПК, в качестве диаминокислоты, пептидогликан и полисахариды, содержащий арабинозу, галактозу и часто маннозу	IV – тип, пептидогликолипид клеточной стенки содержит мезо-ДПК, аланин, глутаминовую кислоту, глюкозамин, муромовую кислоту, арабинозу и галактозу.
Распространение	Широко распространены в природе.	Встречаются в почве, воде, в тканях теплокровных и холоднокровных животных
Типовой вид	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

## Физиологические признаки

Признаки	Corynebacterium	Mycobacterium
Наличие: n – нитрофенолоксидазы b- галктозидазы	-	-
Чувствительность к (мкг/мл): - цефалоридину, стрептомицину (100) - Ванкомицину, рифампицину (50) - изониазиду (200) - флуороурацилу(20) - хромомицину A <sub>3</sub> (10) - бреомицину(2,5) - митомицину C (5) - лизоциму - нитрофурантоину(700)	+ + - - - - - + +	- - БРМ ± БРМ ± БРМ- БРМ ± БРМ ± - -
Арисульфатазная активность (через 2-недели)	-	±
Разложение этиленгликоля	-	БРМ-
Кислотоустойчивость после 4-часовой экстракций клеток пиридином	-	+
Анаэробное усвоение глюкозы (тест R. Hugh и E. Leifson)	±	-

**Примечание:** БРМ – быстрорастущие микобактерии

± - признак положительный или отрицательный в зависимости от вида

## Хемотоксономические признаки

Признаки	Corynebacterium	Mycobacterium
Нуклеотидный состав ДНК, % - ГЦ	51-61	62-74
Миколовые кислоты <sup>1</sup>	22-36 (8-18)	60-90 (12-18)
Туберкулостеариновая кислота	-,редко +	+
Фосфолипиды	ФГ, ФИ, ФИМ	ФЭ, ФИ, ФИМ
Липид LCN – А типа	+	-
Основные минохиноны	МК-8 (H <sub>2</sub> ) МК-9 (H <sub>2</sub> )	МК-9 (H <sub>2</sub> )
В состав пептидогликана входит кислота: N - ацетилмурамовая N - гликолилмурамовая	+ -	- +
Наличие железосвязывающих веществ (микобактины или накобактины)	-	+

**Примечание:** <sup>1</sup>- В скобках указана число атомов углерода, в молекуле жирных кислот образующихся при пиролизе.

МК – n(Hm) – менахиноны, где n- число изопреновых единиц.

m – Число гидроизопреновых единиц умноженное на 2.

ФИМ – Фосфатидилинозитманнозиды.

ФИ – Фосфатидилинозит.

ФГ – Фосфатидилглицерин.

ФЭ – Фосфатидилэтаноламин.

**Идентифицирующие признаки:** Идентификации подлежат чистые культуры бактерии, выросшие на селективных для коринебактерий средах с определенными морфологическими и тинкториальными свойствами. Часто в практических условиях для получения ясной биохимической характеристики коринебактерий достаточно определения ферментов расщепляющих углеводы. Вести учет ферментативных особенностей позволяет среда Гисса в которую

добавляли индикатор и вещество, разлагаемое ферментом, содержащиеся в исследуемой культуре. Изменение реакции среды, в результате деятельности ферментов, выражалась в изменении цвета среды.

**Среда Гисса:** К 100 мл. дистиллированной воды, добавляли 0,5г. кислого фуксина и 16.5 мл. 4% раствора NaOH. Раствор на сутки ставили в термостат, периодически встряхивали, выдерживали 2 суток на свету, а затем в темном месте. Устанавливали реакцию pH 7,2, кипятили, фильтровали, добавляли 0,5% углеводов. Короткий ряд: лактоза, мальтоза, сахароза, манноза и галактоза. Длинный ряд: арабиноза, ксилоза, рамноза, фруктоза, трегалоза и т.д. В ряд необходимо вводить мочевины, так как, ее расщепление позволяет дифференцировать коринебактерий. В среду добавляли также вещество, способствующий росту коринебактерий – нормальная сыворотка или асцитическая жидкость ( таблица 40).

Определяя организмы, относящиеся к видам коринебактерий по перечисленным ферментативным свойствам, нужно иметь, введу и другие рода, включающие виды, которые легко могут быть отнесены к исследуемому роду. Поэтому в практике, в план исследования, должны быть включены и другие определения: ферменты, уреазы, цистиназы, фосфатазы и желатиназы.

Обладающая абсолютной специфичностью к определенным субстратам, фермент уреазы расщепляет мочевины на аммиак и углекислый газ. Для определения, к 100 мл, стерильного бульона pH 7.0, добавляли 1 г. мочевины и 0,2 мл. крезолового красного (1,6% раствор в спирте). Разливали по 2-3 мл, в стерильные пробирки, стерилизовали текучим паром 10 мин. Результаты посева учитывали через 20-24 часа. При наличии фермента происходило покраснение среды.

Таблица 40

Данные по разложению коринебактериями углеводов



Виды Коринебактерий	Лакто- за	Мальто- за	Сахаро- за	Манно- за	Галак- тоза	Араби- ноза	Ксило- за	Рамно- за	Фрук- тоза	Трега- лоза	Моче- вина	Гидро- лиз Тиро- зина	Цисти- наза	Фосфа- таза	Жела- тиназа	Восстнов нитрита в нитраты
<i>C. cystitidis</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-		-	-	-
<i>C. diphtheriae</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
<i>C. kutsheri</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>C. matruchotii</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	d		-	-	-	+
<i>C. minutissimum</i>	-	+	+	d			-		+	-	-		-	+	-	-
<i>C. mycetoides</i>	-	-		-	-	-	-			d	-		-	+	-	-
<i>C. pilosum</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> ( <i>C. hofmani</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>C. pseudotuberculosis</i>	-	+	d	+	+	d	-	-	+	-	+	-	-	-	-	d
<i>C. renale</i>	-	d	-	+	-	-	-	-	+	d	+	-	-	-	-	-
<i>C. striatum</i> ( <i>C. flavidum</i> )	d	+	-	+	d	-	-	-	+	d	-	+	-	+	-	-
<i>C. xerosis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. amycolatum</i>	-	(+)	d	+	-	-	-	-	+	d	d	-	-		-	
<i>C. bovis</i>	d	+	-	-	-	d	-	-	+	d	-	-	-	+	-	-
<i>C. jeikeium</i>	-	d	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	-	-
<i>C. paurometabolum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. vitarumen</i>	-	+	+	+	+				+	+	+		-	-		+

[-] -11 -20% - штаммы положительные.

[+] - 90% - штаммы положительные.

[(+)] - 80-89% - штаммы положительные.

[d] - 21-79% штаммы положительные

Пробел – определение не проводили

Наличие фермента цистиназы, определяли по тесту расщепления цистина (на среде Пизу). Принцип действия основан на реакции расщепления L-цистина ферментом цистиназой, содержащийся в коринебактериях. Образующийся при этом сероводород вступает в реакцию с цитратом висмута, образуя сернистый висмут соединения темно-коричневого цвета. Для приготовления, к 90 мл 1,5% расплавленного агара, приготовленного на Бульоне Мартена pH 7,6, добавляли 2 мл. 1% раствора Цистина, приготовленного на 0,1N растворе серной или хлористоводородной кислоте, тщательно перемешивали и добавляли 2 мл. 0,1N раствора NaOH. Агар разливали во флаконы и стерилизовали в течение 30 минут при 0,5 атм. Перед употреблением к расплавленной и охлажденной до 50°C среде, добавляли 1 мл 10% раствора ацетата свинца (стерилизованного двукратно текучим паром), перемешивали и добавляли 10% нормальной лошадиной или бычьей сыворотки. Среду разливали по 2 мл. в пробирки, посев производили уколом в столбик среды и инкубировали при t 37°C. Результаты учитывали через 24 часа. При наличии цистиназы происходило почернение среды по ходу укола и образование «облачка», коричневого цвета на расстоянии 10 мм, от поверхности среды.

Группоспецифический к сходным по своему строению веществам фермент фосфатаза, катализирует гидролиз моноэфиров ортофосфорной кислоты. Определяли добавлением к 100мл. растопленного и охлажденного до 45°C питательного агара, 50 мг. паранитрофенилфосфата. Осторожно, остерегаясь образования пузырей, перемешивали и стерильно разливали в чашки. После подсушивания застывших чашек производили посев методом бляшек. На одной чашке можно испытать до 20 культур. После 24 часов содержания в термостате, при содержании в культуре фосфотазы, вокруг бляшек появлялось желтое окрашивание среды.

Наличие фермента желатиназы определяли по методу Ле-Минора. Принцип основан на способности протеолитического фермента гидролизовать желатину до водорастворимых соединений.

Реактивы необходимые для приготовления среды.

- Засвеченная и проявленная фото- и киноплёнки.
- Калий фосфорнокислый однозамещенный 1/15 моль/л.
- Натрий фосфорнокислый двузамещенный 1/15 моль/л. (высушенный на - воздухе в течение 12-14 дней)
- Приготовление растворов:

Раствор А. Растворяли 9,078 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в 1 л дистиллированной воды.

Раствор Б. Растворяли 11,876 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  в 1 л дистиллированной воды. Для получения фосфатного буфера, 1/15 моль/л, рН 7,1 брали 33,4 мл раствора А и 66,6 мл раствора Б и смешивали.

Ход исследований: Использовали фото- и киноплёнку, предварительно засвеченную, проявленную и фиксированную. Плёнку нарезали на квадраты размером 5x5 мм, стерилизовали в чашках Петри в автоклаве при 0,5 атм. ( $115^{\circ}\text{C}$ ) 30 минут (для предупреждения слипания плёнок их помещали между прокладками фильтровальной бумаги). Стерильную плёнку помещали в пробирки с взвесью 18-20 часовой агаровой культурой микробов, в 1/15 моль/л растворе фосфатного буфера, рН 7,1. Просветление 3/4 или всей поверхности плёнки считали положительным результатом. Срок наблюдений составляло от 1 до 5 дней.

Многие виды коринебактерий, используют в качестве источника азота, нитраты, что означает синтез клетками фермента нитратредуктазы. Способность клеток восстанавливать нитраты в нитриты, показывает наличие фермента. Выявляли на среде, состоящей из МПБ и 0,2%  $\text{KNO}_3$ . Среду разливали в пробирки, опускали поплавки и стерилизовали при 1 атм. Посев выдерживали в термостате 7-10 дней. Для обнаружения нитритов использовали крахмало-йодную пробу или реактив Гисса.

*Реактив Гисса:* 1. Раствор сульфаниловой кислоты: 0,5 г сульфаниловой кислоты, растворяют в 30 мл ледяной уксусной кислоты.

Добавляют 100 мл дистиллированной воды и фильтруют. Раствор устойчив в течение месяца.

2. Раствор а-нафтиламина: 0,1 г а-нафтиламина, растворяют в 100 мл кипящей дистиллированной воде. Остужают и добавляют 30 мл ледяной уксусной кислоты. Раствор фильтруют и хранят не более недели.

Равные объемы данных растворов, смешивают непосредственно перед употреблением.

*Реактивы для крахмала-йодной пробы на нитраты:*

1. Крахмал - 0,4 г  
ZnCl<sub>2</sub> - 2,0 г  
H<sub>2</sub>O - 100 мл

ZnCl<sub>2</sub> растворяют в 10 мл воды, кипятят и добавляют крахмал. Доводят объём до 100 мл и оставляют на неделю. Затем раствор фильтруют и добавляют равный объём 0,2%-ного раствора KI.

2. Раствор соляной кислоты: Концентрированная – HCl – 16 мл, вода – 84 мл.

Крахмало – йодная реакция основано на том, что нитриты в кислой среде окисляют йодистый цинк с выделением йода, присутствие которого обнаруживается крахмалом. К капле раствора содержащего ZnCl<sub>2</sub>, KI и крахмал, добавляли каплю HCl и каплю культуры. При наличие нитритов, появлялось синее окрашивание.

Реакция с реактивом Гисса основано на образовании в кислой среде в присутствии нитритов и ароматических аминов ( сульфаниловой кислоты и а- нафтиломина), азотсоединения, окрашенного в красно-розовый цвет. К капле реактива Гисса, добавляли каплю культуры. Появление красного окрашивания свидетельствует о присутствии нитритов.

Набор реагентов для микрообъемной биохимической идентификации коринебактерий « микро-коринебакт – 200», на основе минимума тестов, позволяет быстро и просто идентифицировать изучаемый организм. Исследованию подлежат чистые культуры, с предварительно определенной принадлежностью к коринебактериям, в тестах на каталазу с 3% раствором перекиси водорода и микроскопией. Набор рассчитан на проведение 200 анализов по 8 тестам: определение цистиназы, уреазы, пиразиномидазы, нитратредуктазы, ферментации глюкозы, фруктозы, сахарозы, крахмала.

Принцип метода состоит в следующем: Дифференциальные среды, входящие в набор, вносили по 100 мкл в лунки полистиролового планшета и засеивали большой массой (1 петля) агаровой культуры испытуемых бактерий. После инкубации при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 18-24 ч и добавления реактивов визуально учитывали результаты по изменению окраски сред.

*Состав набора реагентов «Микро-коринебакт -200»:*

Среда с мочевиной, 22 мл – 1 фл.

Среда с глюкозой, 22 мл – 1 фл.

Среда с фруктозой, 22 мл – 1 фл.

Среда с сахарозой, 22 мл – 1 фл.

Среда с крахмалом, 22 мл – 1 фл.

Среда на нитратредуктазу, 22 мл – 1 фл.

Среда на пиразинамидазу, 22 мл – 1 фл.

Среда на цистиназу, 25 г – 1 уп.

Масло вазелиновое стерильное, 11 мл – 1 фл.

Реактив на нитратредуктазу №1, 11 мл – 1 фл.

Реактив на нитратредуктазу №2, 1 мл – 1 фл.

Соль Мора, 0,1 г – 1 фл.

Пустой флакон для приготовления 1% раствора соли Мора – 1 фл.

Планшет полистироловый 96 луночный для иммунологических реакций однократного применения – 18 шт.

Инструкция по применению – 1 шт.

Дифференциальные среды вносили в день исследования в планшеты каплями из флаконов с капельницами по 100 мкл в лунку (4 капли), кроме среды на цистиназу. Среду на цистиназу готовили и вносили пипеткой в лунки по 200 мкл из расплавленной среды, приготовленной ранее (исходя из необходимого количества анализов по прилагаемой инструкции). Среда для изучения одной культуры размещали в одном ряду из 8 лунок в постоянной последовательности: на цистиназу, уреазу, пиразинамидазу, ферментацию глюкозы, фруктозы, сахарозы, крахмала, нитратредуктазу. Количество рядов соответствует количеству культур и один ряд контрольный (без посевов).

Агаровую культуру изучаемых бактерий засеивали петлей – уколом в среду на цистиназу, в остальные лунки с жидкими средами вносили по одной петле культуры и размещивали. Петлю прожигали только в начале и в конце посева в лунки одного ряда. На поверхность среды с мочевиной наносили после посева, по 50 мкл (2 капли) стерильного вазелинового масла. Планшеты с посевами инкубировали при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 18 – 24 ч. После инкубации, в лунки со средой на пиразинамидазу, добавляли 50 мкл (2 капли), свежеприготовленного раствора 1% соли Мора, (в пустой флакон, вносят 0,1 г соли Мора, добавляют 10 мл дистиллированной воды и перемешивают), а в лунки со средой на нитратредуктазу, по 50 мкл реактивов на нитратредуктазу №1 и №2.

Результаты учитывали визуально по изменению окраски питательных сред, сравнивая с окраской сред в контрольных лунках. При этом испытано всего 56 штамма коринебактерий, как музейные, так и свежевыделенные (таблица 41). Положительная реакция:

почернение среды по ходу посева уколом и «дымка» в среде вокруг хода укола; (цистиназа)

появление бурой окраски среды сразу после добавления раствора соли Мора; (пиразинамидаза)

появление темно-вишневой окраски среды сразу после добавления реактивов №1 и №2; (нитратредуктаза)

изменение цвета среды с оранжевого на малиновый; (уреаза)

изменение окраски среды красной на желтую, ферментация глюкозы, фруктозы, сахарозы, крахмала

## Результаты биохимической идентификации коринебактерий

Вид, биохимический вариант бактерий	Цистин аза	Уреаза	Пирази намида за	Ферментация				Нитрат редуц таза
				Глюко за	Фрукто за	Сахаро за	Крах мал	
<i>C. diphtheriae</i> biovar gravis, mitis	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	+	-	+	+	+/-	-	+/-
<i>C. pseudodiphthericum</i>	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>C. xerosis</i>	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>C. jeikeium</i>	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> spp.	-	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-

+ - 95% результаты положительные

- - 95% результаты отрицательные

+/- - 50% на 50%

В поисках более простых и экономичных методов для ускоренной биохимической идентификации коринебактерий предложено микротестсистема (МТС – К) [162]. Сущность его заключается в использовании малых объемов плотной углеводной среды в виде ограниченных по объему капель, посев большого количества микробных клеток на 1 мл среды и использование наиболее чувствительных индикаторов. При оптимальной температуре (37°), малых объемах среды и значительной концентрации микробов, происходит ускоренное расщепление углеводов, что приводит к изменению  $P^H$  среды и изменению первоначальной окраски.

Суточную агаровую культуру коринебактерий брали бактериологической петлей, разводили стерильной дистиллированной водой до концентрации 1,5 – 2 млрд. микробных клеток (по отраслевому стандарту

мутности ГИСК им Л.А. Тарасевича). Контейнер микротест - системы помещали на рабочий стол, маркировали, снимали покрывную липкую ленту, а затем в каждую ячейку при помощи стерильной пипетки вносили по 0,1мл приготовленной взвеси исследуемой культуры. Контейнер закрывали крышкой или липкой лентой и помещали в термостат. Учет результатов осуществляли через 24 часа инкубации, по изменению цвета среды в ячейках контейнера. В течение этого времени (в случае вовлечение субстрата, присутствующего в среде, в метаболизм исследуемого микроорганизма) накапливались продукты сдвигающие  $P^H$  в кислую или щелочную сторону, что выявлялась через изменение цвета среды, содержащей индикатор (положительная реакция). Если субстрат остается первоначальным (реакция отрицательная).

Предложенные цветовые указатели для учета биохимических свойств позволяли сравнивать с ними полученные в полистироловом контейнере результаты, и устанавливать видовую принадлежность коринебактерий. (Табл. 18).

С использованием микротест-системы для экспресс идентификации коринебактерии по ключевым тестам: (ферментация глюкозы, сахарозы, крахмала, наличие уреазы), нами испытаны 45 музейных и 33 свежесыведенных штаммов коринебактерий, родов: *C. xerosis*, *C. pilosum*, *C. cystitidis*, *C. pseudotuberculosis*, *C. diphtheria* (таблица 42).

Таблица 42

Микротест-система для биохимической идентификации коринебактерии

Тест – ситемы	глюкоза	сахароза	крахмал	уреаза
<i>C. xerosis</i>	+	+	-	-
<i>C. pilosum</i>	-	-	-	-
<i>C. cystitidis</i>	+	-	+	-



C. pseudotuberculosis	-	+	-	-
C. diphtheria.	+	-	+	-

(МТС-К).

Цветовой указатель к микротест-системе для биохимической идентификации коринебактерий (МТС-К)

Тест	Положительная реакция	Отрицательная реакция
Утилизация глюкозы	Желтый	Красный
« сахарозы	Желтый	Красный
« крахмала	Желтый	Красный
Наличие уреазы	Малиновый	Светло-желтый

### **2.8.2. Разработка комплексного аллергена из микобактериоподобных микроорганизмов, испытание в лабораторных и производственных условиях**

Установлено, что основной причиной проявления реакций на туберкулин у здоровых животных является сенсibilизация атипичными микобактериями, имеющими общие антигены с возбудителем туберкулёза[91,102,103,152,154]

Кроме того, причиной сенсibilизаций макроорганизма к туберкулину могут быть нокардий и родококки, имеющие общие родоспецифические данные с микобактериями[190,196,198].

В этой, связи огромный интерес представляют коринебактерий, имеющие с микобактериями общие физико-химические и биологические свойства, и широко распространённые в природе (М.О.Баратов 2001, 2007, 2010.,О.А.Нестеренко1978,1990.,GorenM.B.1978)

Имеются сообщения о том, что заражённые коринебактериями животные реагируют на ППД-туберкулин для млекопитающих (М.О.Баратов 2010, 2013, М. В. Goren1972. R. Hagh 1953).

Многообразие причин, способствующих сенсбилизациям животных к туберкулину затрудняет дифференциальную диагностику туберкулёза, что в конечном итоге оборачивается значительным экономическим ущербом для хозяйств.

Поэтому возникает необходимость определения специфичности аллергии, результаты которых могут привести к повышению эффективности аллергического метода при диагностике туберкулёза животных.

Для аллергической диагностики туберкулёза у крупного рогатого скота используют ППД – туберкулин для млекопитающих, для получения которой *M.bovis*, штамм №8, выращивают на среде Сотона, в течение 2-х месяцев [71]. Дифференциацию, сенсбилизаций вызванной птичьим видом микобактерий, проводят в симультанной пробе, с использованием очищенного туберкулина для птиц и ППД - туберкулина для млекопитающих. Туберкулин для птиц готовят из *M.avium*(штамм №2282), и по разнице интенсивности реакций, определяют причину сенсбилизаций.

Известен в широкой практике и комплексный аллерген из атипичных микобактерий (КАМ), полученный из *M.scrofulaceum* №12-С и *M.intracellulare* №13-Н [231]. Для его получения культуру выращивают на синтетической среде Сотона, осаждают белок трихлоруксусной кислотой и пересаждают серноокислым аммонием. В дальнейшем проводят диализ для удаления солей. Содержание единиц (ЕД.), в растворе белка каждого вида, определяют на заражённых гомологичными микобактериями морских свинок в сравнении с препаратами известной активности. Полученные таким образом моноаллергены смешивают в равных количествах по содержанию единиц. Несмотря на выраженные дифференцирующие свойства, в сравнении с туберкулином для птиц, комплексный аллерген из атипичных микобактерий имеет и существенный

недостаток: эффективность его зависит от степени родства микобактерий, вызвавших сенсibilизацию и микобактерий использованных для изготовления аллергена[268].

Получены также аллергены из нокардий и родококков [153,154,156,161], которые в составе комплексного аллергена, повышают эффективность симультанной пробы с ППД - туберкулином при дифференциации неспецифических реакций. (Патент на изобретение №2217165 « Комплексный алерген для дифференциации аллергических реакций у крупного рогатого скота на ППД-туберкулин для млекопитающих» от 27 ноября 2002 года). Кроме того, аллергены из *N.asteroides* и *R. bronchialis* используется для аллергической диагностики нокардиоза и родококковой инфекций.

Недостатком данного аллергена является низкая эффективность в симультанной пробе в случаях сенсibilизации крупного рогатого скота другими микобактерияподобными микроорганизмами, в частности коринебактериями. Учитывая это, нами было решено расширить антигенную структуру комплексного аллергена из атипичных микобактерий, нокардии и родококков дополнительным внесением коринебактериозного сенситина, с целью повышения чувствительности и специфичности аллергена, а в конечном итоге - эффективность симультанной пробы. Для этого, в комплексный аллерген из атипичных микобактерий и микобактериоподобных микроорганизмов, в частности нокардий и родококков, содержащий в качестве дифференцирующих антигены из *M.scrofulaceum* №12-С, *M. intracellulare* №13-Н, *N.asteroides* ВКМ Ас 1077 и *R. bronchialis* ИМВ Ас 737, дополнительно внесли коринебактериозный аллерген из *Corinebacterium xerosis* N1911 [42].

Для экспериментальной проверки аллергена предварительно изготовили сенситин из коринебактерий. Для чего, культуру коринебактерий (*Corynebacterium xerosis* N1911), выращивали на усовершенствованной нами синтетической среде Сотона с добавлением смеси индивидуальных n- алканов, содержанием в цепи от 10 до 17 атомов

углерода, в течение 2-х месяцев. Результаты испытаний показали большую эффективность модифицированного варианта для выращивания коринебактерий, биомасса которых превышало контрольные серии более 2-х раз. Это позволило получить два раза больше активного белка к единицы объема. Колбы с культурой, где толщина слоя бакмассы достигал около 1 см, автоклавировали при 1,5 атм. в течение 30 мин. Бактериальную массу отделяли фильтрацией и центрифугированием, после чего проводили осаждение белка. Из объёма супернатанта в количестве 1,5 литров осаждением в изоэлектрической точке NaCl (18% -концентраций, при 4,1 РН) получили 3,2 гр. белка. Осадок промывали, высушивали и расфасовывали в стеклянные флаконы и хранили в холодильнике.

В дальнейшей работе при изготовлении аллергена мы исходили из пороговой единицы белка коринебактерии определенная нами, которая соответствует -0,0003 мг.

В дальнейшем при изготовлении комплексного аллергена, брали по 1350 действующих единиц каждого компонента в 0,2 мл. раствора и 0,0003 мг белка коринебактерий, которая была нами принята за единицу. Для этого 20,25 мг влажной культуры *Corynebacterium xerosis* смешали с 10 мл. комплексного аллергена (атипичные микобактерии, нокардии, родококки и коринебактерии).

Для получения рабочего раствора (1:45) содержащего 15 единиц действия в 0,1 мл, на морскую свинку, в 8,8 мл физраствора растворяли 0,2 мл (1350 ед) аллергена.

Испытание аллергена проводили на заражённых микобактериями (*scrofulaceum*, БЦЖ), коринебактериями (*xerosis*), нокардиями (*asteroidis*) и родококками (*bronchialis*) морских свинок, через 27 дней после заражения. Каждой культурой заражали по 5 морских свинок и 5 находились на контроле.

Исследование проводили в политесте. Опытным морским свинкам на депилированный участок реберной поверхности, вводили заявляемый аллерген с одной стороны и комплексный антиген с другой в дозе 0,1 мл

(15 ед). Оценку реакций проводили через 24 часа после введения.  
 Результаты приведены в таблице 43.

Таблица 43

Интенсивность реакций у заражённых морских свинок на заявляемый  
 аллерген

№	Вид заражаемой культуры	Кол-во животных в опыте	Интенсивность реакций в мм <sup>2</sup> на			
			Заявляемый аллерген	M±m	Комплексный аллерген	M±m
1	C. xerosis	1	125,10	114,36 ±3,60	102,19	88,76 ±4,03
		2	115,15		77,14	
		3	109,23		86,16	
		4	118,12		88,15	
		5	104,19		90,17	
2	M. scrofulaceum	1	102,13	103,57 ±5,83	98,15	92,75 ±3,66
		2	126,13		101,14	
		3	100,18		86,16	
		4	94,29		96,18	
		5	95,12		82,13	
3	M. БЦЖ	1	93,18	92,76 ±3,74	97,12	98,14 ±2,49
		2	87,17		99,11	
		3	82,18		103,19	
		4	98,13		89,16	
		5	103,15		102,14	
4	N. asteroides	1	108,15	108,56 ±4,34	88,17	88,97 ±4,46
		2	101,16		101,13	
		3	97,17		96,17	
		4	116,18		76,18	
		5	120,12		83,18	
5	R. bronchialis	1	100,16	100,16 ±3,77	88,16	91,95 ±4,01
		2	87,18		79,13	
		3	107,14		102,15	
		4	98,18		98,14	
		5	108,12		92,16	
6	Контроль	1	-	-	-	-
		2	-	-	-	-
		3	-	-	-	-

		4	-	-	-	-
		5	-	-	-	-

Данные таблицы 37 показывают, что морские свинки, зараженные *S. xerosis*, *M. scrofulaceum*, *N. asteroides* и *R. bronchialis*, реагировали на опытный аллерген заметно интенсивнее, нежели на комплексный. В группе, зараженных *M. БЦЖ*, реакция на комплексный аллерген была незначительно выше.

Таким образом, у морских свинок, заражённых коринебактериями, атипичными микобактериями, нокардиями и родококками, аллерген с содержанием коринебактериозного сенсирина по чувствительности значительно превосходит прототип. Следовательно, данный аллерген позволит выявлять животных инфицированных перечисленными микроорганизмами, что повышает эффективность метода симультанной пробы при дифференциации неспецифических реакции на туберкулин.

Производственное испытание аллергена провели в хозяйстве, где среды коров и нетелей разного возраста, постоянно выявлялись реагирующих на ППД-туберкулин животные, где результаты симультанной пробы с КАМ оставались неопределёнными.

Опытный аллерген был испытан на 136 животных. При этом 24 головы отрицательно реагировало (реакция на опытный аллерген интенсивнее, чем на ППД-туберкулин); положительно (реакция на ППД-туберкулин интенсивнее) - 6 голов; одинаково - 2 головы.

Таким образом, установлено достоверность интенсивности реакции на опытный аллерген, чем на ППД-туберкулин для млекопитающих, из чего следует, что животные сенсibilизированы неспецифически и нет никакой необходимости их выбраковке. Экономическая эффективность заключается в предотвращение неоправданного убоя животных, сокращении расходов на проведение специальных ветеринарно-санитарных мероприятий.

## 2.9. Разработка универсальной среды для микобактериоподобных микроорганизмов

Накопленные на сегодняшний день научные и практические данные по лабораторному выявлению микобактериоподобных микроорганизмов не позволяют определить универсальную, простую в изготовлении, доступную и эффективную питательную среду для культивирования, поэтому для повышения результативности приходится пользоваться несколькими средами. Нередко, при выборе сред исходят из лабораторных возможностей, доступности сред, пренебрегая при этом диагностическими свойствами [196].

Для изолирования коринебактерий широко используют питательные среды: нитритный агар по Виноградскому, среда Сотона, кровяной агар, кровяно-теллуритовый агар, среда Клауберг II, среда Бучина и тд, к недостаткам, которых относятся, определённые сложности в изготовлении, низкая высеваемость, слабые ингибирующие свойства по отношению к сопутствующей микрофлоре, низкие дифференцирующие свойств и тд [162].

Низкими диагностическими свойствами также характеризуются среды для выделения и выращивания нокардий и родококков, т с. среда Мюнца, УМ-агар, среда с овсяной мукой, декстрозный агар, питательный бульон и др. [182,196].

В сложившихся условиях возникла настоятельная необходимость в конструировании универсальной питательной среды, для культивирования углеводородокисляющих микроорганизмов, обладающие диагностической ценностью и практической значимостью.

Предлагаемую (универсальную) среду готовили следующим образом. Взяли панкреатический гидролизат кильки -31,7 г, Д-глюкозу-16,0 г,  $\text{KН}_2\text{PO}_4$  - 0,17 г,  $\text{MgSO}_4$  -0,2 г, водный голубой -0,28 г, натрий углекислый -0,3 г  $\pm 0,05$ , агар микробиологический – 8,1 г  $\pm 1,0$  ( $\text{pH}$  7,4 $\pm 0,2$ ), добавили геотермальную воду до 1 литра и 5% стерильной дефибринированной крови животных. В процессе размешивания не допуская образование пены, вносили 4-5 капель смеси н-алканов (парафин), разлили в чашки Петри. После застывания среду слегка подсушили в термостате при температуре (37 $\pm 1$ ) $^\circ\text{C}$  в

течение 40-60 минут. Цвет готовой среды темно- синий. Хранили в холодильнике, использовали в течение 3-4 суток (М.О. Баратов, А.Х. Найманов, М.И. Нажалов, Э.А. Вердиева 2016).

Остальные среды готовили по прописи авторов[162].

Оценку сред проводили посевом тест - штаммов и свежевыделенных культур коринебактерий, нокардий и родококков. В качестве музейного штамма использовали *Corynebacterium xerosis* N1911, *N.asteroides* ВКМ Ас 1077 и *R. bronchialis* ИМВ Ас 737. а нативным материалом служили лабораторные штаммы, выделенные из объектов внешней среды (почва, корма, навоз и кровь крупного рогатого скота).

Культуру каждого штамма высевали в 8 чашках Петри каждой среды. Коринебактерии на нитритный агар по Виноградскому, среду Сотона, кровяной агар, кровяно-теллуриновый агар, среду Клауберг II, среду Бучина и на универсальную среду. Нокардии и родококки - среду Мюнца, УМ-агар, среду с овсяной мукой, дакстрозный агар, питательный бульон, универсальная среда.

Для соблюдения равнозначности опыта материал высевали равными дозами (500 клеток в 0,1 мл.). При учёте результатов провели сравнительный анализ эффективности сред изучаемых образцов с предлагаемым по скорости и интенсивности роста, по величине колоний и ингибирующим к сопутствующей микрофлоре свойствам. Результаты учитывали через 24 и 48 часов. Опыты повторялись двукратно. Результаты отражены в таблицах 44, 45.

Таблица 44

Характеристика роста нокардий и родококков на питательных средах.

Среды	Показатель прорастания колоний в (++++)				а Величин колоний в мм.
	24часа		48часов		
	Тест	Нативный материал	Тест штаммы	Нативны й	



	штаммы			материал	через 48 часов
1.Среда Мюнца	+	-	+	+	0,8 - 1,2
2.УМ-агар	-	-	+	++++	1,3 - 1,5
3.Среда с овсяной мукой	+	-	++++	+	0,9 - 1,6
4.Декстрозный агар	-	-	-	+	1,3 - 1,7
5.Питательный бульон	+	++++	++++	++++	0,7 - 1,9
6.Универсальная среда	++	++	++	+++	1,5 - 1,8

Примечание:      + + + +      -      Сплошной рост. Колоний не поддаются подсчету  
                          + + +      -      Обильный рост (от 13 до 23 колоний)  
                          + +      -      Умеренный рост (от 4 до 12 колоний)  
                          +      -      Скучный рост (от 1 до 3 колоний)  
                          -      -      Рост отсутствует

Как видно из таблицы 44, по результатам проведенных исследований, среда Мюнца и декстрозный агар показали низкие ростовые свойства 1-2 колонии. Низкие ингибирующие постороннюю микрофлору свойства обнаружили на среде с овсяной мукой, аналогичная картина на УМ-агаре, на фоне слабых ростовых свойств.

На питательном бульоне колонии не поддаются подсчету, из-за обильного роста посторонней микрофлоры.

На универсальной среде обнаружили умеренный рост на первые сутки с тест штаммами и с нативным материалом – до 12 колонии, на вторые сутки – до 23 колонии в чашках с нативным материалом, но фоне хороших ингибирующих постороннюю микрофлору свойств.

Таблица 45

Характеристика роста коринебактерий на питательных средах.

Среды	Показатель прорастания колоний в (++++)				а Величин колоний в мм. через 48 часов
	24часа		48часов		
	Тест штаммы	Нативный материал	Тест штаммы	Нативны й материал	
1.Нитритный агар	+	-	+	+	1,3 - 1,5
2.Среда Сотона	+	++	+	++	1,9 - 2,1
3.Клауберг II	-	+	-	+	1,3 - 1,8
4.Кровяной агар	++	++	++++	++++	1,4 - 2,1
5.Кровяной- теллуритовый агар	+	++	+++	++++	2,3 - 2,6
6. Сывороточный агар	++	++	++++	++++	1,9 - 2,6
7.Среда Бучина	+	++	++	++	2,4 - 2,7
8.Универсальная среда	++	++	+++	+++	2,1 - 3,2

Примечание:

++++	-	Сплошной рост. Колоний не поддаются подсчету
+++	-	Обильный рост (от до 23 колоний)
++	-	Умеренный рост (от 4 до 12колоний)
+	-	Скудный рост (от 1 до 3 колоний)
-	-	Рост отсутствует

Как видно из таблицы 45 рост колоний на среде Бучина формировался на первые сутки от 1 до 3 колоний с тест штаммами и умеренным ростом с нативным материалом от 4 до 12 колоний. На вторые сутки количество колоний в чашках с тест штаммами увеличилось до 12 колоний.

По ростовым свойствам кровяной и кровяно-теллуриновые агары не уступают среде Бучина, но рост колоний формировался на фоне низких ингибирующих свойств по отношению к сопутствующей микрофлоре.

Низкими дифференцирующими свойствами обладает и сывороточный агар, где обнаружили обильный рост сопутствующей микрофлоры на вторые сутки.

Эффективность нитритного агара и Клауберг II была самой низкой. Слегка заметный рост обнаружили на средах через 48 часов.

Слегка заметное помутнение обнаружили на среде Сатона, на вторые сутки картина практически не изменилось.

Предлагаемая среда показала высокие дифференцирующие и ингибирующие свойства. Колонии появились на первые сутки в количестве от 4 до 12 в чашках с тест штаммами и с нативным материалом. На вторые сутки обнаружили обильный рост в обеих чашках до 23 колонии, без сопутствующей микрофлоры, что является показателем высокой ингибирующей активности. Рост отличался не только числом, но и характером и размером колонии.

Таким образом, проведенные исследования показали, что универсальная среда (М-10), для микобактериоподобных микроорганизмов обладает хорошими ростовыми свойствами на фоне высокой активности ингибирующей постороннюю микрофлору свойств. Кроме того, среда отличается от остальных вариантов по массивности выросших колонии, что в конечном итоге является показателем диагностической ценности и практической значимости универсальной среды.

## **2.10. Сравнительная характеристика аллергенов в диагностике туберкулеза КРС**

Основным методом диагностики в настоящее время является внутрикожная туберкулиновая проба. Однако, частое проявление реакций на

туберкулин у животных, сенсibilизированных атипичными и сапрофитными, а также микобактериоподобными микроорганизмами делают результаты этой пробы ориентировочными. Следует отметить, что проблема неспецифических реакций особо актуально в благополучных, и оздоравливаемых хозяйствах. По данным Найманова А.Х., (2012) г. в последние годы в благополучных хозяйствах РФ реагирующих животных выявлено в 22,5 раза больше, нежели в неблагополучных.

Проявление неспецифических реакций в благополучных хозяйствах в РД отмечается независимо от вертикальной зональности, но с заметным увеличением количества реагирующих в равнинной зоне -3,79%, против -2,64% в предгорной и -1,98% горной зонах. Неспецифические реакции являются серьезным тормозом в успешной реализации комплекса мероприятия по профилактике и ликвидации туберкулеза, в связи, с чем возникает настоятельная необходимость применения целого комплекса методов для их дифференциации [23,24,30,33,50,52].

Не умаляя значимость диагностической ценности симультанной пробы с КАМ, предложенного в практику для дифференциации неспецифических реакций, следует указать на его малую эффективность. По литературным данным дифференцирующая способность данной пробы колеблется от 0 до 77%. Кроме того, применение КАМ в симультанной пробе практически не возможно при исследовании ограниченного числа животных (менее 6 голов), принадлежащих частному подворью, хотя в структуре поголовья КРС в республике более 80% скота принадлежат частному сектору.

В этой связи, актуально изыскание наиболее действенных методов и схем, для дифференциации неспецифических реакций на туберкулин, как в общественном, так и в частном секторе, что в конечном итоге позволит значительно сократить неоправданный убой здоровых животных и снизить размеры экономического ущерба.

Цель исследований. Определение диагностической ценности симультанной пробы с ППД-туберкулином для млекопитающих и КАМ, с ППД-туберкулином для млекопитающих и ППД-туберкулином для птиц в

благополучных по туберкулезу хозяйствах КРС, сенсibilизированных атипичными микобактериями.

Исследования проводили в соответствии с «Наставлениями по проведению симультанной аллергической пробы с применением туберкулина и комплексного аллергена из атипичных микобактерии (КАМ) при диагностике туберкулеза у животных»(2002г).

Диагностическую ценность аллергенов изучали на животных в благополучных по туберкулезу СПК республики: «Жданова», «С.Габиева», «Ботлихский», «Мушилинский», КФХ « Правда» - горная зона; «Бугленский», « У. Буйнакского», совхоз «Тельмана», «Ленина» и КФХ «Заря» - предгорная зона; Совхоз «Рассвет», СПК «Казбеково», « Бабаюртовский», КФХ « Кума» и « Гелинский», - равнинная зона. В данных хозяйствах при плановых исследованиях систематически выявлялись реагирующие на туберкулин животные, у которых последующим туберкулез не подтверждался.

Всего исследовано 1675 голов крупного рогатого скота, принадлежащих 15 хозяйствам 8 районов, расположенных во всех почвенно- климатических зонах республики - горной, предгорной и равнинной.

Исследование проводили перекрестно, в октябре и апреле месяце: осенью ППД-туберкулином для млекопитающих и комплексным антигеном из микобактерий, весной - с ППД-туберкулином для млекопитающих и ППД-туберкулином для птиц.

Наши данные показывают, что в хозяйствах горной зоны у животных убитых с диагностической целью, реагиовавших на туберкулин, в большинстве случаев выделяются атипичные микобактерии *M.phlei*, *M.smegmatis*, *M.fortuitum*-IV гр. (по Раньону)- 73,4% ., *M.scrofulaceum* – II гр. – 3,1%.

В СПК «Жданова» из 87 голов КРС выявлено 16 (18,3%) реагирующих животных, из них в симультанной пробе с использованием ППД-туберкулина для млекопитающих и КАМ с большей реакцией на ППД-туберкулин – (+) 8, меньшей – (-) -12, одинаковой – (=) 4. Результат симультанной пробы более

достоверно выражен на КАМ. При весенних исследованиях 86 голов выявлено реагирующих 17 (19,7%) животных. В симультанной пробе с ППД-туберкулином для млекопитающих и ППД-туберкулином для птиц с большей реакцией на ППД-туберкулин для млекопитающих 3 головы, меньшей - 10, равной - 4 головы. Результат симультанной пробы остался неопределенным.

В хозяйстве «Саида Габиева» при исследовании 126 голов в октябре месяце выявлено 15 (11,9%) реагирующих животных, из них на ППД-туберкулин для млекопитающих – 1 голова, на КАМ-9 голов, с одинаковой реакцией – 5 голов. Результат симультанной пробы достоверно более выражен на КАМ. В апреле из 124 голов реагировало 16 (12,9%) животных, из них: на ППД-туберкулин для млекопитающих 2 головы, ППД-туберкулин для птиц – 12, с равной реакцией 2 головы. Результат достоверно более выражен на ППД-туберкулин для птиц.

В СПК «Ботлихский» при осенних исследованиях 89 голов КРС выявлено 14 (15,7%) реагирующих животных, из них: с большей реакцией на ППД-туберкулин для млекопитающих 2 головы, меньшей реакцией – 10, равной – 2 головы. Результат достоверен, более выражен на КАМ. В весенних исследованиях 87 голов выявлено -12 (13,7%) реагирующих животных. Из них на туберкулин для млекопитающих -3 головы, - туберкулин для птиц – 6, у 4 голов реакции были одинаковы. Результат остался неопределенным.

В «Мушилинский» в октябре исследовано 96 голов, выявлено 9(9,3%) реагирующих, из них с большей реакцией на ППД-туберкулин 1 голова, меньшей -8 голов. Результат достоверен, выражен на КАМ. В апреле из 96 голов реагировало 11(11,4%) голов, из них на туберкулин для млекопитающих 2 головы, на туберкулин для птиц 8, с равной реакцией 1 голова. Результат остался неопределенным.

В КФХ «Правда» исследовано осенью 112 голов, выявлено 10(8,9%) реагирующих, из них: на туберкулин - 1 голова, на КАМ – 9 голов. Результат достоверен, животные реагируют на КАМ. При весенних исследованиях 110

голов, выявлено 8(7,2%) реагирующих, из них: на туберкулин для млекопитающих -1голова, туберкулин для птиц – 7 голов. Результат остался неопределенным.

В хозяйствах предгорной зоны из патматериала реагировавших на туберкулин животных, убитых с диагностической целью, в основном изолируются представители III группы атипичных микобактерий (*M. avium-intracellulare*)-64,7%, быстрорастущие микобактерии IV группы (*M. smegmatis*, *M.fortuitum*) – 19,8%, и в незначительных количествах - представители II группы (*M.scrofulaceum*)- 3,8%. Следует отметить, что на территориях предгорной и равнинной зон республики расположены многочисленные птицекомплексы, принадлежащие частным и коллективным хозяйствам. На наш взгляд такое соседство выступает основной причиной, способствующий постоянной циркуляции комплекса *M. avium-intracellulare* как в объектах внешней среды, так и в организме животных. Кроме того, по территории этих зон проходит скотопрогонная трасса, где имеет место тесный контакт перегоняемого скота с местным поголовьем.

В СПК «Бугленский» в октябре исследовано 134 головы, выявлено 36(26.8%) реагирующих, из них: с большей реакцией на туберкулин 6 голов, меньшей -17, одинаковыми реакциями -13 голов. Результат достоверно выражен на КАМ. При весенних исследованиях 130 голов реагировало 33(25,3%), из них: на ППД-туберкулин для млекопитающих 4 головы, ППД-туберкулин для птиц -15, одинаково -14. Результат достоверен, выражен на ППД-туберкудин для птиц.

СПК «У.Буйнакского» в октябре исследовано 143 головы, реагировало 28(19,5%), из них на туберкулин -8голов, на КАМ -13, с одинаковыми реакциями -7голов. Результат не определен. В апреле исследовано 141 голова, реагировало -32(26,6%). На ППД-туберкулин для млекопитающих-бголов, на ППД-туберкулин для птиц -17 , одинаково -9. Результат достоверно более выражен на туберкулин для птиц.

В совхозе «Тельмана» при исследовании 106 голов в октябре, выявлено 12(11,3%) реагирующих только на КАМ. В апреле из 105 голов реагировало

18(17,1%), из них: на ППД-туберкулин для млекопитающих 2 головы, ППД-туберкулин для птиц -10 голов, одинаково – 5. Результат симультанной пробы достоверно более выражено на ППД-туберкулин для птиц.

В КФХ «Ленина», осенью исследовано 74 головы, реагировало 8(10,8%), из них: с большей реакцией на ППД-туберкулин -2 головы, меньшей -4, одинаковыми реакциями -2 головы. Результат неопределен. В апреле из 74 происследованных реагировало 12(16,2%) только на ППД-туберкулин для птиц: «Заря» исследовано в октябре 102 головы, реагировало 16(15,6%) животных, из них: на ППД-туберкулин для млекопитающих -2 головы, на КАМ-10, одинаково -4 головы. Реакция достоверно более выражено на КАМ. В апреле исследовано 101 голова, реагировало 17(16,8%), из них: на туберкулин для млекопитающих -4, туберкулин для птиц -10 голов, у 1 животного реакция была одинаковая, у 2 голов стерты, не поддаются определению. Результат неопределен.

Изолированные атипичные микобактерий из патматериала от животных реагировавших на туберкулин в хозяйствах равнинной зоны в процентном соотношении распределяются следующим образом, - II гр. (*M.scrofulaceum*) – 4,7%, III-гр. (*M. avium-intracellulare*) – 66,3%, IV-гр. (*M. smegmatis*, *M.fortuitum*, *M.phlei*)-23,4%.

В совхозе «Рассвет» при осенних исследованиях 115 голов КРС, выявлено 23(20,0%) реагирующих животных, из них: с большей реакцией на ППД-туберкулин для млекопитающих -6, меньшей -11, одинаковыми реакциями -6 голов. Результат симультанной пробы неопределен. При весенних исследованиях 113 голов реагировало 27(23,8%) животных, из них: на ППД-туберкулин для млекопитающих -4 головы, ППД-туберкулин для птиц -15, с одинаковыми реакциями -7 голов. У 1 животного реакция осталась неопределенной. Результат симультанной пробы достоверно более выражено на ППД-туберкулин для птиц.

Из 93 исследованных в КФХ «Гелинский» животных в октябре реагировало 16(17,2%), из них: на туберкулин -2 головы, КАМ -10 голов, одинаково -4. Результат определен, выражен на КАМ. В августе реагировало



18(19,3%) животных, из них: на туберкулин для млекопитающих -1, туберкулин для птиц -11, одинаково -6 голов. Результат достоверно более выражен на ППД-туберкулин для птиц.

В СПК « Казбекова» осенью исследовано 140 голов, реагировало 26(18,5%), из них: с большей реакцией на туберкулин для млекопитающих - 4голови, меньшей -14, одинаково 8 голов. Результат достоверно более выражен на КАМ. При весенних исследованиях реагировало 24(17,1%) животных, из них: с большей реакцией на ППД–туберкулин для млекопитающих-3голови, меньшей-11,одинаково -10 голов. Результат неопределен.

В хозяйстве «Бабаюртовский» из 166 голов исследованных, реагировало 44(26,5%) животных, из них: на туберкулин для млекопитающих -6голов, КАМ -19, одинаково -19. Результат определен и выражен на КАМ. При исследовании в апреле выявлено 40(24,0%), из них: на ППД-туберкулин для млекопитающих-5, ППД-туберкулин для птиц -16, с одинаковыми реакциями -19 голов. Результат симультанной пробы достоверно более выражен на ППД-туберкулин для птиц.

В КФХ « Кума» исследовано 92голови, выявлено 19(20,6%) животных, из них: с большей реакцией на туберкулин для млекопитающих -2, КАМ -12, одинаково -5 головы. Животные определенно реагировали на КАМ. При весенних исследованиях реагировало 18(19,5%), из них: на туберкулин для млекопитающих -3, туберкулин для птиц -9,одинаково -6 голов. Результаты остались не определенными.

Таким образом, в благополучных хозяйствах реакция на туберкулин проявляется независимо от вертикальной зональности. Из общего числа происследованных количество реагирующих составило -17,4%, в том числе: в горной зоне -12,5%, предгорной -18,9% и равнинной -21,0%.

## **2.11. Совершенствование мер борьбы с туберкулезом КРС с учетом зональных особенностей**

В практике современного животноводства при дифференциации аллергических реакций на туберкулин возникает необходимость применения большого комплекса диагностических тестов, что связано с выявлением в стадах животных с парааллергическими реакциями на туберкулин. Частое выявление животных с неспецифическими реакциями на туберкулин сделало ее ориентировочной при первичной постановке диагноза. Вместе с тем, массовый характер проявления неспецифических реакций у животных в ранее благополучных по туберкулезу хозяйствах приводит к значительному экономическому ущербу, связанному с неоправданным убоем и проведением комплекса профилактических и оздоровительных мероприятий.

В связи с возникшей ситуацией встала новая проблема по дифференциации специфических и неспецифических реакций. На сегодня предложено множество разнообразных схем комплексной диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота, из-за отсутствия единого метода позволяющего реально установить или отклонить диагноз в каждом конкретном случае. Наши исследования показали, что для этих целей с успехом можно применять внутривенную и пальпебральную пробы с ППД-туберкулином для млекопитающих, предусмотренные «Наставлением по диагностике туберкулеза животных».

В настоящее время диагностика туберкулеза еще более усложнилась, что связано с тем, что с 1991 года в агропромышленном комплексе страны происходят глубокие социально-экономические преобразования, связанные с переходом на рыночные отношения, разукрупнением совхозов и колхозов, образованием предприятий разнообразных форм собственности. Так, в структуре поголовья крупного рогатого скота по России более 60%, а по Республике Дагестан - 97% скота приходится на индивидуальные хозяйства. Соответственно, увеличилось количество животных в частном подворье.

Нередки случаи, когда фермерскими хозяйствами и гражданами приобреталось поголовье из расформированных неблагополучных по туберкулезу ферм. При этом повысилась опасность возникновения новых мелких очагов болезни, что важно в эпизоотологическом и эпидемиологическом отношении. Такая ситуация закономерно привела к изменению стратегии и тактики борьбы с туберкулезом. Поскольку профилактика и меры борьбы с этой инфекцией основаны на диагностике, востребованными оказались методы, позволяющие вести индивидуальный учет и оценку результатов исследований.

При оценке результатов симультанной пробы с КАМом следует учитывать все реакции, по каждой корове с критериями аллергических реакций: «+» (положительная), «-» (отрицательная), «=» (сомнительная). Исходя из этого, на наш взгляд, за положительные следует считать реакции животных с большей интенсивностью на ППД-туберкулин для млекопитающих, отрицательную - с большей интенсивностью на КАМ, сомнительную – реагирующих одинаково на разные аллергены (с разницей не более 2 мм). Предлагаемая методика вписывается в рамки требований унифицированных методов диагностики туберкулеза в странах Европейского Союза.

Массовое выявление неспецифических реакции в благополучных хозяйствах обострило проблему этиологического фактора сенсibilизаций.

Атипичные микобактерии, рассматриваемые как основной объект сенсibilизации макроорганизма к туберкулину, выделяются в 48,9% случаев от реагирующих и в 52,6% случаев от нереагирующих на туберкулин животных. В этой связи изолирование атипичных микобактерий из организма реагирующих животных не дает гарантию рассматривать их как объект сенсibilизации. Кроме того, не все представители данной группы обладают одинаковыми сенсibilизирующими свойствами, что ставит в зависимость диагностическую ценность симультанных проб с ППД-туберкулином для млекопитающих и КАМ, ППД-туберкулином для млекопитающих и ППД-туберкулином для птиц. Так, по чувствительности и

диагностической значимости проба с ППД-туберкулином для млекопитающих и КАМ намного превосходит в хозяйствах горной зоны, где сенсibilизация животных обусловлено в основном представителями IV-гр. атипичных микобактерий. В хозяйствах предгорной зоны, где изолируют представители III- группы, значимость ППД-туберкулина для птиц и ППД-туберкулина для млекопитающих выше. В равнинной, где в основном изолируют представители *M avium-intracellulareae*, диагностическая ценность аллергенов равнозначная.

Кроме того, установлено, что факторами неспецифической сенсibilизации к туберкулину являются также близкородственные к микобактериям таксоны *Corinebacterium*, *Nocardium*, *Rhodococcus*, которых следует дифференцировать, как имеющие широкую распространенность не только в объектах внешней среды, но и в организме животных. Так, коринебактерии выделены из биоматериала в 52,12% случаях и 43,33% из объектов внешней среды, нокардий - 35,71% и 43,65% и родококков - 64,28% и 56,34% соответственно. Все они с микобактериями имеют общие физико-химические, физиологические, хемотоксономические и генетические свойства. Из них нами разработаны сенситины, изучены физико-химические свойства и в эксперименте определена возможность использования их для дифференциации аллергических реакций. Полученные результаты позволили нам разработать комплексную систему дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. Установлено, что сконструированные моноаллергены из коринебактерий и нокардий позволяют аллергически диагностировать также и коринебактериоз и нокардиоз.

Кроме того, комплексные аллергены, на основе КАМ и коринебактериозного сенситина, КАМ и сенситинов из нокардии и родококков, а также КАМ и сенситинов из коринебактерий, нокардий и родококков, позволяют надежно дифференцировать аллергические реакции при первичной постановке диагноза в благополучных по туберкулезу хозяйствах. При использовании этого комплекса удается выявить

анергичных животных, как в частном подворье, так и в крупных стадах, что способствует ускорению оздоровления хозяйств. Использование комплексного аллергена повышает эффективность симультанной пробы при дифференциации неспецифических реакций на туберкулин.

Природно – климатические условия Дагестана прямо или косвенно влияющие на иммунологический статус животных, ставят реактивность организма животных на туберкулин в зависимость от сезонов года. Число реагирующих на туберкулин животных заметно возрастает в весенне-осенние месяцы, на которых приходится более 70,5% реагирующих.

Исходя из изложенного, контрольно-диагностические исследования на туберкулин в хозяйствах горной и предгорной зонах, считаем целесообразным проводить один раз в год – осенью, перед постановкой животных на стойло, в плоскостной - два раза, весной (март, апрель, май) и осенью (сентябрь, октябрь), затем осуществлять постоянный контроль осмотром туш убойных животных.

Среди методов диагностики особое место занимает бактериологическое исследование биоматериала от животных, поскольку является самым достоверным. В этой связи нами было проведено сравнительное изучение наиболее часто используемых для изолирования коринебактерий сред, где наилучшей оказалась среда Бучина, хотя качественная характеристика ее оставляет желать лучшего. Поэтому нами дистиллированная вода заменена геотермальной как дополнительный источник минеральных солей. При сравнительном изучении данная среда значительно превосходило первоначальный вариант по высеваемости коринебактерий из биоматериала на 65-70% , скорости роста на 1-2 дня и по накоплению биомассы.

Следует отметить, что отсутствие диагностических сред для идентификации микобактериоподобных микроорганизмов создает определенные трудности в работе. В этой связи нами сконструирована универсальная питательная среда (М-10), на основе кильки, парафина, крови

и геотермальной воды, которая обладает хорошими ростовыми и ингибирующими свойствами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Происшедшие общественно-политические изменения в стране и в системе хозяйствования в том числе, закономерно привели к изменениям в животноводстве, в частности, в эпизоотической обстановке по многим особо опасным болезням и пересмотру стратегии и тактики профилактических и противоэпизоотических мероприятий. Переход животных в частные руки, рост крестьянских, фермерских и подсобных хозяйств, стало возможным после ликвидации и разукрупнением хозяйств государственного сектора.

На конец, 2015 года сельское хозяйство республики состоит из 45 совхозов, 36 колхозов, 1965 сельскохозяйственно-производственных кооперативов и 13874 крестьянско-фермерских хозяйств.

Среди регионов РФ Дагестан занимает первое место по поголовью МРС, лидирующее - по КРС и количеству дойных коров. На 01. 01. 2015 г. в республике насчитывается животных (в тыс. гол): крупный рогатый скот – 949,5; мелкий рогатый скот – 5061,2; птица – 2699,9; лошади – 29,4; свиньи - 0,8; собаки -40,0; кошки – 22,0; пчелосемьи -840,0.

В республике идет планомерное сокращения численности крупного и мелкого рогатого скота в хозяйствах с государственной (республиканской) формой управления и закономерный рост его в хозяйствах частно-партнерской собственностью. В настоящее время количество животных перешедших в частные руки в республике насчитывается более 96% .

Вместе с тем, ослаблен общий контроль над производством, снизились экономические возможности многих хозяйств, ухудшились условия содержания и кормления скота. Паралельно с этим растет значимость микобактериозов и количество параспецифической сенсibilизации животных к туберкулину.

При сложившейся обстановке стало необходимым уточнение особенностей эпизоотологии туберкулеза крупного рогатого скота в условиях республики.

Анализ материала за 55 лет (1960-2015) показал, что эпизоотический процесс по туберкулезу КРС в Дагестане можно подразделить на 4 периода:

-первый период (1960-1975 гг.) характеризуется наибольшим числом неблагополучных пунктов в 1964 году, широким распространением туберкулёза (хозяйствах 31 района из 39), выявлением значительного количества неблагополучных пунктов (125), заболевших (1896) и инфицированных (1786) животных;

- второй (1978-1993) значительным распространением туберкулёза в 96 хозяйствах 28 районов;

-третий (1994-2006 гг.) улучшением ситуации по туберкулезу - не регистрируется с 2002 по 2005 год. Это объясняется уменьшением численности поголовья КРС в республике более чем в 2 раза, ( 1476300 голов (1989), до 674000 (2002), ликвидацией и разукрупнением комплексов промышленного типа, созданием мелких, подсобных, фермерских хозяйств, отсутствием регистрации неблагополучных очагов в индивидуальных хозяйствах;

-четвертый период (2007-2015 гг.) связан с относительной стабилизацией общей ситуации в стране в целом и в Республике, хотя контрольно-комиссионные исследования показывают высокую степень зараженности скота. Туберкулез был установлен в 23 хозяйствах, где зарегистрировано 142 неблагополучных пункта, из которых в плоскостной зоне – 86, предгорной – 38 и горной – 18.

Рост числа хозяйств, в которых у реагирующих на туберкулин животных обычно не подтверждается туберкулез, требует уточнения эпизоотической ситуации. Постепенное расширение масштабов диагностических исследований, ужесточение контроля за передержкой больного скота и передвижениями животных, обеспечили его стабилизацию. Анализ причин возникновения туберкулеза в благополучных хозяйствах

показал, что болезнь нередко распространяется вследствие введения в стада больных туберкулезом животных.

Имеются случаи заноса возбудителя с кормами, рецидивы болезни в ранее оздоровленных хозяйствах как результат некачественного проведения карантинно-санитарных мероприятий. Потенциальными источниками инфекции в оздоравливаемых хозяйствах являются и анергичные животные, количество которых в отдельных стадах может достигнуть до 2% [80].

Проведенные нами исследования свидетельствуют, о том, что основной причиной обострения эпизоотического процесса по туберкулезу является запаздывая диагностика и некачественное проведения ветеринарно – санитарных и организационно-хозяйственных мероприятий, на что указывает высокий коэффициент очаговости во вновь выявленных неблагополучных хозяйствах.

Анализ накопленного материала позволяет нам определить зоны высокого риска заражения скота возбудителем туберкулеза и другими микобактериозами, уточнить «время риска» (сезон максимальной опасности заражения) и оптимизировать сроки контрольных исследований животных на туберкулез.

Установлено, что эпизоотическую стационарность туберкулез имеет в хозяйствах равнинной зоны. Неблагоприятные факторы внешней среды, снижающие физиологическую сопротивляемость организма животных в данной зоне, создают предпосылки для появления и развития туберкулеза. В хозяйствах горной зоны, благодаря благоприятным условиям внешней среды, как решающий фактор, туберкулёз выявляется в виде спорадических случаев. Также установлено наличие зависимости параспецифической сенсibilизации животных от природно-климатической зональности.

На территории равнинной зоны, где преобладают каштановые солонцовые почвы, выявление животных с неспецифическими реакциями в 5-6 раз превышала средний республиканский показатель. По многочисленным литературным данным количество кислотоустойчивых



микобактерий имеют прямую зависимость от характера почв [7, 185, 188], с чем и согласуются полученные нами в условиях республики данные.

Проведенный помесечный анализ изменений эпизоотических показателей в благополучных стадах во всех почвено-климатических зонах республики позволил определить периоды наибольшего выявления реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих животных (март-июнь и сентябрь-октябрь). Данные показывают повышенный риск заражения животных в период наибольшей концентрации при стойловом содержании, в то же время, достаточно высокий уровень иммунобиологической реактивности осенью.

Полученные данные позволяют внести коррективы в сроки проведения плановых контрольно-диагностических исследований животных с учетом региональных природно-географических и хозяйственных условий. Считаем целесообразным проведение диагностических аллергических исследований крупного рогатого скота в хозяйствах горной и предгорной зон один раз в год (осенью) перед постановкой животных на стойло, равнинной – 2 раза (весной – апрель – июнь и осенью – сентябрь - октябрь) и осуществлять постоянный дальнейший контроль. Необходимо также ввести эпизоото-эпидемиологический мониторинг, уделяя особое внимание на исследования животных частного подворья.

Частое выявление у животных неспецифических реакций на ППД-туберкулин для млекопитающих и увеличение количества животных с неопределенными реакциями на туберкулин в симультанной пробе с КАМ показало необходимость определения причин неспецифических реакций на туберкулин и усовершенствования дифференциации. Так, исследованиями, проведенными в 44 хозяйствах 26 районов, в различных географических зонах республики, в благополучных хозяйствах выявлено 18,12% реагирующих животных, что согласуются с данными других исследователей [1, 2].

По данным ряда исследователей [159] зараженность животных атипичными микобактериями является свидетельством улучшения ситуации

по туберкулёзу в неблагополучных хозяйствах, т.е. увеличения проблемы неспецифических реакций, есть показатель оздоровления хозяйств от туберкулеза. В тоже время, сложности связанные с дифференциацией неспецифических реакций на туберкулин, особенно в благополучных хозяйствах при первичной постановке диагноза, нередко приводят к значительному экономическому ущербу.

Данные исследователей по сравнительному соотношению микобактерий в биоматериалах от реагирующих на туберкулин животных и объектах внешней среды, неоднозначны. Наши исследования показали, что в обоих случаях соотношение выделения почти одинаковое (атипичные 65,7% - 62,16 % и *M. bovis* 15-16,2 %). Из атипичных культур в горной зоне преобладают представители IV группы Раньона (55,6%), предгорной - микобактерии III- группы, в равнинной- представители III и IV гр. 66.3% и 23,4% соответственно.

Проведенный сравнительный анализ статистических данных за 27 лет по идентификации выделенных культур микобактерий показал снижение количества *M. bovis*, что, на наш взгляд, связано с уменьшением диагностических исследований с 1995 года. В то же время повышение коэффициента очаговости во вновь выявленных неблагополучных хозяйствах, указывающий на некачественное проведения профилактических, ветеринарно-санитарных и хозяйственных мероприятий и на запоздалую диагностику, настораживает. Вместе с тем, следует полагать, что официальные данные ветеринарной отчетности не отражают истинное положение эпизоотической ситуации по туберкулезу, сложившейся в настоящее время и требует уточнения. Подтверждением является ухудшающаяся эпидемиологическая ситуация и увеличение количества *M. bovis* (32,6 %), выделяемых от больных туберкулезом людей. Вместе с тем имеются данные, показывающие об увеличении случаев выделения *M. tuberculosis* из биоматериалов от животных [2, 90].

Имеются сообщения, подтверждающие возможность сенсбилизаций организма животных к туберкулину коринебактериями, нокардиями и

родококками [117], которые с заметной частотой изолируются из биоматериала от реагировавших на туберкулин животных [95, 117].

Результаты наших исследований, почвы – 234 пробы, кормов (комбикорма, солома, остатки силоса в кормушках) – 260, воды из разных источников – 250, навоза – 150, отобранных из разных населенных пунктов равнинной зоны республики, крови - 90 проб, молоко – 30 проб, лимфатические узлы - 35 проб, показывают на широкое распространение коринебактерий в объектах внешней среды и в продуктах животного происхождения, что подтверждается выделением их из биоматериала в 48,23% случаях и 68,12% из объектов внешней среды.

Распространение нокардий и родококков изучали в 290 пробах почвы навоза, корма и воды, взятых из хозяйств расположенных на различных природно-климатических зонах и 37 пробах крови. В результате чего выделено 171 культура из объектов внешней среды, в том числе нокардий – 75 (25,86%), родококки 96 (33,10%), из крови 16 (43,24%), соответственно 6 (16,21%) и 10 (27,02%).

Обнаружение коринебактерий нокардий и родококков в пробах почв из различных районов природно-географических зон с различной кислотностью показывает на их способность выживать на средах, не только лишённых притока питательных веществ, но и даже в солонцовых с высоким содержанием солей. Коринебактерии и родококки часто выделяются особенно из почв богатых нефтепродуктами (около нефтяных скважин) и в участках почвы наиболее загрязненных длительным и частым пребыванием животных. Наши данные согласуются с мнениями других исследователей [13, 73, 74, 111, 117]. В то же время сенсibiliзирующая способность организма животных коринебактериями к туберкулину недостаточно изучена.

Изучение динамики аллергических реакций на туберкулин у зараженных коринебактериями морских свинок показало, что зараженные коринебактериями реагируют на туберкулин в течение 90 дней (срок наблюдения). Отмечена также реакция их, зараженных микобактериями

на коринебактериозный сенситин, до 60 дней. Очевидно, что все изученные культуры вызывали сенсibilизацию организма морских свинок к туберкулину.

Близкородственность антигенной структуры между коринебактериями и микобактериями выявлена и в реакциях РБТЛ, РСЛЛ, РОК, и в РТМЛ.

Опыты на кроликах показали, что нокардии и родококки как и атипичные микобактерии сенсibilизируют организм животных к туберкулину.

Исследования показали, что заражённые микобактериями животные реагируют интенсивно на ППД – туберкулин для млекопитающих стабильно с высокой интенсивностью, и с меньшей - на нокардин, а зараженные накардиями на нокардин и с меньшей на туберкулин. У кроликов зараженных *M. scrofulaceum* и *M. phlei* реакция сохранилась на протяжении всего опыта. На родококковый аллерген в течение всего опыта реагировали только зараженные родококками и микобактериями кролики с высокой интенсивностью. Интенсивность реакции всегда была выше на гомологичный заражению аллерген. Результаты наших исследований совпадают с литературными данными [223].

Родоспецифическую общность между микобактериями, нокардиями и родококками нами подтверждено и в иммунологических реакциях (РСК, РНГА, РОК, РБТЛ, РСЛЛ и других). Положительные перекрестные результаты получены в реакции связывания комплемента, туберкулезных антигенов с сыворотками, полученных от зараженных нокардиями и родококками кроликов. Выявленные титры антител с гомологичными антигенами значительно превышали в сравнении с титрами с гетерологичными антигенами. Результаты реакции непрямой гемагглютинации с эритроцитарным полисахаридным диагностикумом *M. bovis* и реакции (РБТЛ, РСЛЛ) были аналогичны.

К сожалению, не представляется возможным сравнить результаты наших исследований с данными других исследователей из-за отсутствие их в доступной литературе.

Дифференциацию коринебактерий, нокардий и родококков от микобактерии проводили по узкому набору признаков, в числе которых метод определения в этанол-эфирных экстрактах липида LCN-A (свободная миколовая кислота). У последних отсутствует нерастворимый в метаноле липид. Коринебактерии от микобактерии и нокардии - методом окисления глюкозы в аэробных условиях (тест Хью и Лефсона). Микобактерии и нокардии не окисляют глюкозу, от родококков по наличию фермента каталазы.

Для стандартизации аллергенов из коринебактерий, нокардий и родококков использовали наиболее, на наш взгляд, оптимальный метод, который предусматривает определение концентрации активного белка в 0,1 см<sup>3</sup> стабилизирующего раствора.

Исходя из этого концентрации сенситинов (0,00005; 0,0001; 0,0002; 0,0003; 0,0004 и 0,0005 мг в 0,1 см<sup>3</sup>) готовили из маточного раствора 10%-ной концентрации.

Для производственного испытания за единицу белка *Corynebacterium xerosis* N1911 была принята - 0,0003 мг в 0,1 мл раствора, *N.asteroides* - 0,0004 мг, а *R.bronchialis* – 0,0003 мг, на которые получили наиболее выраженные реакции в кожной пробе. Наши данные согласуются с данными Т.П. Вишнёвского [62].

При изготовлении комплексного аллергена исходили из принятых пороговых единиц, брали по 1350 ед. действия каждого компонента по аналогии КАМ. Испытание проводили на заражённых микобактериями (*scrofulaceum*, БЦЖ), коринебактериями (*xerosis*), нокардиями (*asteroidis*) и родококками (*bronchialis*) морских свинок, где реакция на аллерген была заметно интенсивнее, нежели на КАМ.

При производственном испытании на животных, где результаты симультанной пробы с КАМ оставались неопределёнными, установлено достоверность интенсивности реакции на опытный аллерген, чем на ППД-туберкулин для млекопитающих, из чего следует неспецифическая сенсibilизация животных.

Полученные результаты исследования, при определений диагностической ценности симультанной пробы с ППД-туберкулином для млекопитающих и КАМ, с ППД-туберкулином для млекопитающих и ППД-туберкулином для птиц, в благополучных по туберкулезу хозяйствах, показали большую диагностическую значимость: в горной зоне – с ППД-туберкулином и КАМ, предгорной зоне – с ППД-туберкулином для птиц, равнинной - дифференцирующие свойства обеих проб были одинаковыми. Это, на наш взгляд, объясняется сенсбилизацией животных разными представителями атипичных микобактерий.

Таким образом, в благополучных хозяйствах реакция на туберкулин проявляется независимо от вертикальной зональности. Из общего числа исследованных количество реагирующих составило -17,4%, в том числе: в горной зоне -12,5%, предгорной -18,9% и равнинной -21,0%.

Сравнительное изучение наиболее часто используемых для изолирования коринебактерий сред, показало практическую значимость и диагностическую эффективность среды Бучина. В то же время, качественные характеристики данной среды не удовлетворяют лабораторных работников. В связи с этим, в целях расширения солевого состава, дистиллированную воду заменили на геотермальную, с минерализацией 5,02 г/л. Исследования показали, что среда обладает высокими дифференцирующими и ингибирующими свойствами.

## **Выводы**

1. Туберкулез крупного рогатого скота в РД носит стационарный характер и имеет тенденцию к распространению, что связано с социально-экономическими преобразованиями и особенностями вертикальной зональности. Удельный вес неблагополучных пунктов составляет – 8,4%, заболевших животных – 17,3%. Эпизоотологические показатели (на 100 тыс. голов) характеризуются: заболеваемостью - 57 голов, реагирующими в равнинной зоне - 21,0%, предгорной – 18,9% и горной – 12,5%.

2. Эпизоотической особенностью туберкулёза крупного рогатого скота в республике является высокая инфицированность, сезонное проявление реагирующих на внутрикожную пробу (май-июнь и сентябрь-октябрь), широкое распространение атипичных микобактерий в природе, выделено из биоматериала (62,16%) и из объектов внешней среды(65,7%). Преобладание в горной зоне представителей IV группы - 55,6%, предгорной III группы -66,3% и равнинной III и IV групп - 23,4%.

3. Широкое распространение коринебактерий, нокардий и родококков в природе подтверждено выделением из биоматериалов и объектов внешней среды: коринебактерий в 52,12% и 43,33% , нокардий - 35,71% и 43,65%, родококков – 64,28% и 56,34% соответственно. При идентификации *C. xerosis* составляла - 62%, *C.bovis* -24%, *N.asteroides* - 68,9%, *R. erhitropolis* – 45,2% и *R. coprofilus* - 20,8%.

4. В этиологии неспецифических реакций важную роль играют микобактериоподобные микроорганизмы - коринебактерии, нокардии и родококки. На коринебактериозный сенситин реагировало 80% из зараженных микобактериями животных со средней интенсивностью ( $4,76 \pm 0,33$ ), на туберкулин - 93,3%. Реагирующих на нокардин составляло 58,9% со средней интенсивностью ( $4,14 \pm 0,09$  мм), а на родококковый сенситин – 17,76% ( $3,84 \pm 0,08$  мм).

5. Интенсивность кожной реакции зависит от содержания активного белка в сенситине. Оптимальными дозами, оттитрованными на морских свинках, являются для *C. xerosis* – 0,0003 мг в 0,1 мл раствора, *N.asteroides* – 0,0004 мг, и *R.bronchialis* – 0,0003 мг.

6. Сенситин из коринебактерий для диагностики коринебактериозных инфекций является более специфическим и чувствительным, что позволяет предотвратить неоправданный убой животных и излишние расходы.

7. Аллерген из атипичных микобактерий КАМ (*M.scrofulaceum* №12-С и *M.intracellulare* №13-Н) и коринебактериозного сенситина (*C. xerosis* N1911) в лабораторных и в практических условиях показал высокую специфичность при дифференциации неспецифических реакций на туберкулин.

8. Расширена антигенная структура КАМ добавлением сенситинов из нокардий и родококков. Аллерген оказался стерильным, безвредным, специфическим и активным.

9. Комплексный аллерген из атипичных микобактерий и микобактериоподобных микроорганизмов, состоящий из КАМ (*M. scrofulaceum* №12-С, *M. intracellulare* №13-Н), нокардий (*N. asteroides* ВКМ Ас 1077), родококков (*R. bronchialis* ИМВ Ас) и коринебактериозного сенситина (*C. хerosis* N1911) показал, значительное превосходство по чувствительности, что позволяет повысить эффективность симультанной пробы при дифференциаций неспецифических реакций на туберкулин.

10. Универсальная питательная среда (М-10) для углеводородокисляющих микроорганизмов (коринебактерий, нокардий и родококков) на основе гидролизата кильки, углеводов, агара, минеральных солей и геотермальной воды и усовершенствованная среда Бучина (с геотермальной водой) обладают хорошими ростовыми свойствами на фоне высокой активности ингибирующих свойств и массивностью колоний.

11. Экономическая эффективность от наших разработок составляет 3 рубля 44 копейки на каждый затраченный рубль.

### **Практические предложения**

1. Рекомендация по диагностике и профилактике туберкулеза КРС, утверждены ученым советом ФГБНУ «Прикаспийский ЗНИВИ» (протокол №6 21.05 2002) НТС комитета правительства РД по ветеринарии (протокол №4 24.06 2002).

2. Мероприятия по оздоровлению хозяйств от туберкулеза утверждены, методическим советом ФГОБУ ВО «ДагГАУ им М.М. Джамбулатова» № 4 от 23.

12. 09. ученым советом ФГБНУ «ПЗНИВИ» протокол №1 от 10. 12. 09. и НТС МСХ РД (протокол №3 от 24.12.09)



3. Рекомендация по профилактике и мерам борьбы туберкулеза КРС в Дагестане, утверждены ученым советом ФГБНУ «ПЗНИВИ» (протокол №2 от 4.02.09), методическим советом ФГБОУ ВО «ДагГАУ им М. М. Джамбулатова» (протокол №7 от 25.03.09), и НТС МСХ РД (протокол №2 от 28.03.09).

4. Дифференциальную диагностику аллергических реакций в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах проводить с использованием гомологичных и моно и комплексных сенситинов из микроорганизмов близкородственных к микобактериям.

5. Изоляцию микобактериоподобных микроорганизмов проводить на универсальной среде (M10) а коринебактерий на усовершенствованной среде Бучина.

### **Перспективы дальнейшей разработки**

Основным методом диагностики туберкулеза в настоящее время является внутрикожная туберкулиновая проба. Однако, частое проявление реакции на туберкулин у животных, сенсibilизированных атипичными и сапрофитными, а также микобактериоподобными микроорганизмами, делают результаты этой пробы ориентировочными. Проявление неспецифических реакций в благополучных хозяйствах в РД отмечается не зависимо от вертикальной зональности, вызывая определенные трудности в успешной реализации комплекса мероприятий по профилактике и ликвидации туберкулеза, в связи, с чем, возникает настоятельная необходимость применять целый комплекс методов для их дифференциации.

Следует, отметить малую эффективность симультанной пробы с КАМ при дифференциации неспецифических реакций, кроме того, его не возможно применить на ограниченном поголовье.

В этой связи, актуально изыскание наиболее действенных методов и схем, для дифференциации неспецифических реакций на туберкулин, как в общественном, так и в частном секторе, что в конечном итоге позволит

значительно сократить неоправданный убой здоровых животных и снизить размеры экономического ущерба. В связи, с чем создание и введение в широкую практику моноспецифических сенситинов из близкородственных к микобактериям микроорганизмов и создание на их основе комплексных аллергенов для дифференциации неспецифических реакции на туберкулин, открывает перспективу решение одной из важных проблем в туберкулезе – диагностику

### Список использованной литературы

1. Авилов В.М. Больше внимания профилактике и борьбе с туберкулезом животных [Текст]/В.М.Авилов, В.Ф. Пылинин, Н.П.Овдиенко, В.А.Ведерников// Ветеринария.-1997.-№8.-С.3-9.
2. Авилов В.М. Эпизоотическое состояние по туберкулезу в РСФСР и меры борьбы с болезнью [Текст] /В.М. Авилов, В.Ф. Пылинин// Ветеринария. -1992. № 1.-С.3-10.
3. Авилов В.М. Больше внимания профилактике и борьбе с туберкулезом животных [Текст] /В.М. Авилов// Ветеринария. –1997. -№8. -С 3-9.
4. Аллахвердиев И.И. Экономические факторы, способствующие распространению инфекционных болезней [Текст] /И.И. Аллахвердиев// Тезисы докл. науч-практ. конф. «Проблемы сельхоз экологии». – Махачкала. -1997. – С141-142.
5. Александров Н.М. Дифференциальная диагностика туберкулеза маралов [Текст]/ Р.И. Ситников, А.А.Иванов, Т.Х. Фаизов// Ученые записи Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - Сельское и лесное хозяйство. - 2013. - № 216.
6. Алексеев А.Ю. Метод культивирования для изучения физиологии микобактерий [Текст] /А.Ю. Алексеев, А.Г. Дурьманов, Ю.Н. Рассадкин //Материалы VIII Съезда Всерос. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов — М., 2002.-Т. 3.-С. 186-187.

7. Александров Н.А. Эпизоотология туберкулеза КРС и организационные формы его искоренения в неблагополучных хозяйствах Северной зоны нижнего Поволжья [Текст] /Н.А. Александров// Автореф. дис. д-ра вет. наук. – Саратов. 1973. -3-24с.

8. Александров Н.А. Обоснование и опыт искоренения туберкулеза крупного рогатого скота методом замены [Текст] /Н.А. Александров// - Саратов.- 1975. -56с.

9. Альшинецкий М.В. Диагностика туберкулеза зоопарковых животных [Текст] /М.В. Альшинецкий //Ветеринарная патология - 2002-№ 1—2 — С. 147—148.

10. Андреев Л.В. О хемотаксономических аспектах липидного обмена бактерий [Текст] /Л.В. Андреев, А.К.Склифас// - Кн. «Биохимия и биофизика микроорганизмов». – Горьки. 1977. -№5. -С.3-9.

11. Базарбаева М.Б. Дифференциация парааллергических реакций на туберкулин у КРС [Текст]//- Бюл. - ВИЭВ – 1990г.

12. Байтерякова Т.И. Персистирование микобактерий в организме крупного рогатого скота [Текст] /Т.И. Байтеряков, И.Н. Рубцова, Ю.А. Макаров// Проблемы туберкулеза. –1982. -№11. -С.59-62.

13. Бакулов И.А. География болезней животных зарубежных стран [Текст]/Бакулов И.А. Таршис М.Г. // -М. –Колос. -1971.

14. Бакулов И.А. Основы эпизоотологического прогнозирования и планирования противоэпизоотических мероприятий [Текст] /И.А. Бакулов// И.А. Бакулова и А.А. Третьякова. – М. - 1979. -С.279-302.

15. Бакулов И.А. Проблема L-форм бактерий в ветеринарии [Текст] /И.А. Бакулов, Т.Я. Зеленцова// - Ветеринария. -1980. –№ 10. –С.23-27.

16. Бакулов И.А. Методические указания по эпизоотологическому исследованию [Текст] /И.А. Бакулов// - М. -1982. –189с.

17. Бакулов И.А. Эпизоотологический словарь – справочник [Текст] /И.А. Бакулов, Г.Г. Юрков, В.А. Ведерников, Ф.М. Орлов// – М. «Россельхозиздат». -1986. – 189 с.

18. Баратов М.О. Выделение из объектов окружающей среды бактерий усваивающих n-алканы [Текст] /М.О. Баратов, Р.А. Нуратинов, Э. А.Вердиева // Тез. докл. XVI – научн. практ. конф. по охране природы Дагестана. Махачкала. - 2001 –С. 204-205.

19. Баратов М.О. Аспекты экологии коринебактерий [Текст] /М.О.Баратов, Р.А. Нуратинов, Э.А. Вердиева // Мат. научн. практ. конф. «Актуальные проблемы туберкулёза» Махачкала - 2002.-С.69-72

20. Баратов М.О. Культуральные и морфологические свойства коринебактерий [Текст] /М.О. Баратов, Р.А. Нуратинов // Вестник ветер. - 2002 -№23-С. 25-27.

21. Баратов М.О. К вопросу токсономии и систематики коринебактерий. [Текст]/М.О.Баратов // Вестник ветеринарии - 2003 -№25-С. 3-8.

22. Баратов М.О. К вопросу о распространённости коринебактерий [Текст] /М.О.Баратов // Мат. научн. практ. конф. «Пробл. вет. медицины в условиях реформ. с/х производства» - Махачкала. -2003. –С. 51-52.

23. Баратов М.О. Некоторые природно-климатические аспекты туберкулёза животных в условиях Дагестана [Текст] /Р.А Нуратинов, М.О.Баратов // Мат. конф., посвящ. 75-летию научной деятельности Вологодской научно-исслед. вет. станции «Научное обеспечение вет. обслуживания живот-ва в условиях реформ. живот. производства». - Вологда - 2007.

24. Баратов М.О. Влияние природно-географических условий Дагестана на интенсивность эпизоотического процесса по туберкулёзу [Текст] / М.О Баратов, М.М. Ахмедов//. Мат. рег. научно-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых учёных ЮФО, посвящ. 75-летию ФГОУ ВПО «ДагГСХА» «Молодые учёные – вклад в реализацию нац. проекта "Развитие АПК"». - Махачкала - 2007.

25. Баратов М.О. Сезонная динамика туберкулёза КРС в РД [Текст] / М.О. Баратов, М.М. Ахмедов // Мат. всеросс. научно-практ. конф., посвящ. 75-летию ДГСХА «Образ, наука, инновац. бизнес с/х регионов» - Махачкала - 2007.

26. Баратов М.О. Эпизоотические особенности туберкулеза крупного рогатого скота в РД [Текст] / М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров // Мат. всеросс. научно-практ конф., посвящ. 75-летию ДГСХА «Образ, наука, инновац. бизнес с/х регионов».- Махачкала - 2007.

27. Баратов М.О. Зависимость интенсивности эпизоотического процесса туберкулеза от природно - географических условий региона [Текст] / М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров // Мат. Юбилей. Конф. Посвящ. 40-летию со дня создания ГНУ ПЗНИВИ « Основ. пробл. вет. медицины и стратегия борьбы с заболеваниями с/х животных в современных условиях». - Махачкала- 2007.

28. Баратов М.О. Диагностика туберкулёза в условиях реформирования сельскохозяйственного производства [Текст] / М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров // Мат. юбилей. конф. посвящ., 40-летию со дня создание ГНУ ПЗНИВИ « Основн. пробл. вет. медицины и стратегия борьбы с заболеваниями с/х животных в современных условиях». - Махачкала – 2007.

29. Баратов М.О. Циркуляция коринебактерии в объектах внешней среды в условиях Дагестана [Текст] / М.О.Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров // Мат. научно-практ конф., посвящ. 70-летию факультета вет. медицины « Достижения вет. науки и практики – с/х производству». - Махачкала - 2008.

30. Баратов М.О. Диагностика, профилактика и меры борьбы с туберкулёзом крупного рогатого скота в Дагестане [Текст] /М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, З.М. Джамбулатов// Мет. рекомендации. -Махачкала - 2009г.

31. Баратов М.О. Дифференцирующие культурально-морфологические признаки коринебактерии [Текст] /М.О.Баратов, М.М. Ахмедов, Сакидибиров О П. //Мат. Всеросс. научно-практ конф. «Повыш. продукт. с/х животных и птицы на основе инновац. достижений». – Новочеркасск. 2009г.

32. Баратов М.О. Сравнительное изучение наиболее часто используемых питательных сред для выделения коринебактерий [Текст] /М.О. Баратов,

М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров //Мат Всеросс. научно-практ конф. «Повыш. продук. с/х животных и птицы на основе инновац. достижений». Новочеркасск - 2009.

33. Баратов М.О. Мероприятия по оздоровлению хозяйств от туберкулёза Мет. Рекомендации [Текст] / М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, З.М. Джамбулатов, О.П. Сакидибиров//.- Махачкала - 2009.

34. Баратов М.О. Сравнительное изучение различных методов лечения болезней сосков вымени [Текст] /М.О.Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров // Ветеринарная патология. - Москва. – 2010. № 2. С. -47-51

35. Баратов М.О. Коринебактерии (Общая характеристика, идентификация, методы выделения и генетические свойства) [Текст] /М.О. Баратов М.О, М.М.Ахмедов, С.Ш.Кабардиев, О.П. Сакидибиров //Мет.рекомендации. - Махачкала - 2010.

36. Баратов М.О. Краткий экскурс в систематику коринебактерий[Текст] /М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров // Мат. междунард. научно-практ. Конф., посвящ. 65- летию победы в ВОВ « Современ. пробл. и перспективы развития аграрной науки».- Махачкала. - 2010.

37. Баратов М.О. Место коринебактерий в микробной экосистеме в условиях Дагестана [Текст] /М.О. Баратов, М.М.Ахмедов, О.П. Сакидибиров // Мат. междунард. научно-практ. конф., посвящ. 65- летию Победы в ВОВ «Современ. пробл. и перспек. развития аграрной науки».- Махачкала. - 2010.

38. Баратов М.О. Народно-хозяйственное значение коринебактерий [Текст] /М.О. Баратов, О.П. Сакидибиров, М.М. Ахмедов, Д.А. Девришов// Мат. междунард. научно-практ. конф. «Современн. пробл, перспек. и инновац. тенденции развития аграрной науки». - Махачкала - 2010.

39. Баратов М.О. Эволюционная приспособленность коринебактерий к макроорганизму [Текст]/М.О.Баратов, О.П. Сакидибиров, М.М. Ахмедов, Д.А. Девришов// Мат. междунард. научно-практ. конф. «Современные пробл, перспек. и инновац. тенденции развития аграрной науки». - Махачкала - 2010.

40. Баратов М.О. К вопросу о детальной классификации коринебактерий [Текст] /М.О. Баратов, О.П. Сакидибиров, М.М. Ахмедов, Н.А. Алиев.// Научно-практ. журнал « Проблемы развития АПК региона». – Махачкала. – 2010. № 4. С.72-76.

41. Баратов М.О. Коринебактерий [Текст]/ М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, З.М. Джамбулатов, О.П. Сакидибиров, Н.А. Алиев// Монография. – 95с. – Махачкала. - 2011.

42. Баратов М.О. Комплексный аллерген для дифференциации аллергических реакций на ППД-туберкулин для млекопитающих[Текст] / М.О.Баратов, М.М. Ахмедов, С.Ш. Кабардиев, А.Д. Алиев// Патент№2409387 Гос. реестр изобретений РФ. -20 января - 2011.

43. Баратов М.О. Сенсибилизирующие свойства коринебактерий к туберкулину [Текст] /М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров, Д.А. Дервишов// Ветеринарная медицина.- № 1. -2011. С.31-33. - Москва.

44. Баратов М.О. Ферментативные свойства коринебактерии [Текст] /М.О. Баратов, О.П. Сакидибиров // Мат. IV-Международ. научно-практ. конф. «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки». Сб. работ. Часть 1. С. 277-279. –Владикавказ. - 2013.

45. Баратов М.О. К выяснению причин неспецифических реакции на туберкулин [Текст]/ М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров // Ветеринарный врач №2. – 2014. С.24-27. -Казань.

46. Баратов М.О. Биосфера коринебактерий [Текст] /М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров // Мат. международ. научно-практ. конф., посвящ. 75-летию факультета вет. медицины «Современн. пробл. и перспек. развития вет. науки» С.69-71. – Махачкала. - 2014.

47. Баратов М.О. Характерные особенности роста коринебактерий [Текст] /М.О.Баратов, М.М.Ахмедов, О.П. Сакидибиров //Мат. международ. научно-практ. конф., посвящ. 75-летию факультета вет. медицины «Современн. пробл. и перспек. развития вет. науки» С.72-73. - Махачкала. - 2014.

48. Баратов М.О. Питательная среда для культивирования коринебактерий [Текст] /М.О.Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров //Ветеринарный врач №5. – 2014. стр. - Казань.

49. Баратов М.О. Динамика аллергических реакций на туберкулин у зараженных коринебактериями животных [Текст] /М.О.Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров // Ветеринарный врач №2. – 2015. стр.- Казань.

50. Баратов М.О. Сравнительная характеристика диагностической ценности симультанных проб [Текст] /М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров, Э.А. Вердиева// Проблемы развития АПК региона.- №1(21) - 2015. - Махачкала. С. 38-41.

51. Баратов М.О. Комплексный аллерген из микобактериоподобных микроорганизмов [Текст] / М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров // Ветеринарный врач -№ 6.. – 2015. С. 22-26. - Казань.

52. Баратов М.О. Туберкулез КРС в Дагестане - проблемы и суждения [Текст] //М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров, У. Ю. Ахмедова // Проблемы развития АПК региона. – Махачкала. – 2016. - №1(25). - Ч.2.С. 73-76.

53. Баратов М.О. Универсальная среда для микобактериоподобных микроорганизмов [Текст]/М.О. Баратов, А.Х. Найманов, М.И. Нажалов, Э.А. Вердиева// Ветеринарный врач № 3. – 2016. С.32-37. - Казань.

54. Баратов М.О. Способ диагностики коринебактериоза и ассоциативных с коринебактериями инфекции у животных [Текст] / М.О.Баратов, А.Х. Найманов// Патент №2592372 Гос. реестр изобретений РФ. - 29 июня 2016.

55. Басыбеков С.Д. Сельскохозяйственные и домашние животные как источники микобактериозов у человека [Текст]/С.Д. Басыбеков// Автореф. диссерт. канд. биол. наук. – М. - 1983. –24с.

56. Буряк Е.И. Эффективность разных способов прижизненной диагностики туберкулеза у КРС [Текст]/ Е.И. Буряк// Ветеринария. – 1986. - №6. – С. 23-25.



57. Бердичевская М.В. Экология углеводородоокисляющих бактерий нефтяных пластов Пермского Прикамья [Текст] /М.В. Бердичевская// Автореф. диссерт. канд. биол. наук. – М. 1983. – С.24.
58. Бессараб Р.И. Совершенствование противотуберкулезных мероприятий при оздоровлении животноводческих хозяйств Прикарпатья [Текст] /Р.И. Бессараб// Автореф. диссерт. канд. вет. наук. – М. - 1982. –20с.
59. Бокун А.О. Рекомендация по борьбе с туберкулезом [Текст] /А.О. Бокун// Новочеркасск. -1976. –С.3-6.
60. Бричко В.Ф. Мероприятия по оздоровлению форм от бруцеллеза или туберкулеза в период контроля [Текст] /В.Ф. Бричко, И.И. Барабанов, И.Я. Беляев, А.П. Березнев// Ветеринария. –1991. –9. –С.25-27.
61. Варбанец Л.Д. Структура и биологическая роль полисахаридов микобактерий, коринебактерий и нокардий [Текст] /Л.Д. Варбанец// Микробиол. журн. –1988. –Т.50. -№5. –С.98-107.
62. Васильева Н.П. Диагностические возможности методики люминесцентной микроскопии и оптимизация культурального метода диагностики туберкулеза [Текст] /Н.П. Васильева, В.Н. Аникин //Тр. Московского НИИ туберкулеза. М., 1981.- С. 40—42.
63. Васильева Н.П. Сравнительная характеристика чувствительности микро-пических методов выявления микобактерий туберкулеза [Текст] /Н.П. Васильева //Лаб. дело. - 1973.-№ 1.-С. 32-34.
64. Василев В.Н. Микозы и микобактериозы легких [Текст] /В.Н. Василев// – София. «Медицина и физкультура». -1971.
65. Васюренко З.П. Состав жирных кислот дифтерийных и непатогенных коринебактерий в зависимости от среды выращивания [Текст] /З.П. Васюренко, К.П. Синяк// ЖМЭИ. –1977. -№4. –С.129-133.
66. Водолазский Д.К. Эпизоотологические особенности течения туберкулеза крупного рогатого скота в хозяйствах различных почвенно-климатических зон Ставропольского края [Текст] /Д.К. Водолазский, А.С. Грибалкин// Сб. науч. тр. Ставропольского СХИ. – Вып. 41. - 2002. –Т.5. – С.51-53.

67. Вейсфейлер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерий /Ю.К. Вейсфейлер Будапешт. Академия наук Венгрии. - 1975. - С. 15-19
68. Вейсфейлер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерии туберкулеза атипичных микобактерии [Текст]/ Ю.К. Вейсфейлер// – Будапешт. - 1975. – 327с.
69. Ветшигора А.Е. Основы иммунологии [Текст]/А.Е. Ветшигора// – Киев. -1975. – 320с.
70. Вишневский Б.И. Применение КЭФ-1 для концентрации микобактерий туберкулеза [Текст] /Б.И. Вишневский //Лаб. дело — 1986.-№ 4 — С. 20-21.
71. Вишневский Б.И. Вирулентность микобактерий туберкулеза [Текст] /Б.И. Вишневский, О.В. Нарвская, С.И. Васильева //Пробл. туб. -2002. -№ 10 - С. 33-36
72. Власенко В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности [Текст] /В.В. Власенко //Винница: «Наука», 1988.- 35 с.
73. Власенко В.В. Экологический мониторинг при туберкулезе крупного рогатого скота [Текст] /В.В. Власенко, А.П. Лысенко, М.А. Дзюмак //Агроко-лопчий журнал 2003.- № 1.- С. 76-79.
74. Воробьева З.Г. Реакция агглютинации латекса для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота [Текст]/ З.Г. Воробьева, А.Л. Лазовская //Тез. докл. науч.-практ. конф. Новосибирск, 1995. - С. 74-75.
75. Воронкова Г.Н. Метод люминесцентной микроскопии в диагностике туберкулеза [Текст] /Г.Н. Воронкова //Лаб. дело. 1986. -№ 6. - С. 106-108.
76. Вышелесский С.Н. Избранные труды [Текст]/С.Н. Вышелесский// – М. «Колос». -1977. – С.89-126.
77. Гельман Х.И. О свойствах туберкулина, полученного из туберкулезных бацилл, выращенных на картофеле [Текст]/ Х.И. гельман//Архив биол. Наук. -1892. – Т.1. –С.138-163.

78. Гертман М.И. Значение L-форм микобактерий в диагностике туберкулеза крупного рогатого скота [Текст] /М.И. Гертман// Тез. докл. науч.-практ. конф. «Интерфикация молочного скотоводства и пути увеличения производства молока» Уральский ДНТП. – Челябинск. -1986. –С.30-31.

79. Голышевская В.И. Совершенствование методов выделения измененных форм микобактерий туберкулеза у больных со стабильными деструктивными изменениями в легочной ткани [Текст] /В.И. Голышевская, Ш.Б. Ахунов, Е.А. Бибиргал// Проблемы туберкулеза. –1987. -№10. –С.61-65.

80. Гулюкин М.М. Методические наставления по проведению исследований при микобактериозах животных [Текст] /А.Х. Найманов, Н.П. Овдиенко. В.А. Ведерников // - Москва. -2012. -85с.

81. Гусейнов Г.К. Роль типовой структуры микобактерий во взаимосвязи эпидемиологии и эпизоотологии туберкулеза [Текст] /В.И. Голышевская// Сбор. науч. тр. ДГМА. – Махачкала. 1996. –С.48-50.

82. Гутира Ф.. Частная патология и терапия домашних животных[Текст]/ Марек, Маннигер, Мохи И // – 1961. – Т.1. –Кн.2. – С. 159-248.

83. Дораселия Г.Я Характеристика пептидолипидов микобактерии и родококков [Текст]/ Н.А.Гагелидзе, Л.Л.Амираняшвили // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. -2000. -№4. –С76-79.

84. Донченко А.С. Сравнительная оценка некоторых диагностических тестов при экспериментальной сенсibilизации КРС различными видами микобактерии [Текст]/А.С.Донченко, В.А.Сетедин, А.Н. Корж, З.З.Будакова // Науч. техн. бюлл. ВАСХНИЛ. – 1984. - №30. – С. 15-19.

85. Донченко А.С. Туберкулез КРС верблюдов и овец [Текст]/А.С. Донченко// Автореф. Доктора вет. наук. -1989.-34с.

86. Донченко А. Туберкулез КРС, верблюдов, яков, овец и пантовых оленей [Текст ] /А.С.Донченко, В.Н. Донченко// – Новосибирск. 1994. – 352 с.

87. Донченко В.Н. Влияние биостимулятора на интенсивность роста возбудителя туберкулеза бычьего вида [Текст] /В.Н. Донченко, С.В. Ионина //Ассоциативные инфекции с.-х. животных и новые подходы к их ликвидации. — Барнаул, 1997. -С. 22-23.

88. Донченко А.С. Диагностика туберкулеза КРС [Текст]/ А.С.Донченко, Н.П. Овдиенко, Н.А.Донченко// – Новосибирск. - 2004. – 306с.
89. Джулина С.И. Методы оздоровления крупного рогатого скота от туберкулеза [Текст]/С.И. Джулина// Сб. науч. тр. ИЭВС и ДВ. «Туберкулез крупного рогатого скота и меры борьбы с ним». – Новосибирск. –1986. –С.3-
90. Дурьманов А.Г. Метод культивирования микроорганизмов *M. tuberculosis*[Текст] /А.Г. Дурьманов, А.М. Шестопалова, Ю.Н. Рассадкин и др. //Патент РФ № 2209829, БИ 22 от 10.08.2003.
91. Евглевский А.А. Выделение чистых культур микобактерий [Текст] /А.А. Евглевский //Тез. докл. республ. науч.- практ. конф — Харьков, 1984.— С. 61-64.
92. Ерошенко Л.А. Использование стандартных сред для выращивания микобактерий [Текст] /Л.А. Ерошенко, А.Н. Шаров, Н.К. Букова // Матер. Всерос. науч. конф. по проблемам хронических инфекций. Омск, 2001. — С. 161-163.
93. Животные и птица сельскохозяйственные [Текст] /Методы лабораторной диагностики туберкулеза// ГОСТ 26072-84. Гос. Комитет СССР по стандартам — М. 1984.- Юс.
94. Земскова З.С. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция [Текст] /З.С. Земскова, И.Р. Дорожкова// М.- Медицина. -1984. –221с.
95. Зыков М.П. Потенциально патогенные микобактерии и лабораторная диагностика микобактериозов [Текст] /М.П. Зыков, Т.Б. Ильина// М. – Медицина. -1978. –174 с.
96. Иванов М.М. Некоторые вопросы борьбы с туберкулезом КРС и специфичность туберкулиновых реакций [Текст]/М.М.Иванов// Бруцеллез и туберкулез сельскохозяйственных животных.- М. –Колос. -1967. -С.204-214.
97. Иванова Н.А. Туберкулинизация кроликов [Текст]/Н.А. Иваново, А.С. Соколова// - Ветеринария. -1988. -№4.

98. Ившина И.Б. Бактерии рода *Rhodococcus* грунтовых вод района нефтяных местонахождений Пермского Предуралья [Текст] /И.Б. Ившина// Микробиология. –1981. 50. -№4. –С.709-714.

99. Ильина Т.Б. Распространение потенциально патогенных и сапрофитных микобактерий в природе и среди домашних животных [Текст] /Т.Б. Ильина, Ю.Ю. Данко// Сб. научн. тр. ЛВИ. –1982. –Вып. 72. –С. 46-52.

100. Каграманов А.И. Об атипичных кислотоустойчивых микобактериях [Текст] /А.И. Каграманов// Пробл. туберкулёза. –1963. –7. – С.69-75.

101. Казиахмедов З.А. Питательная среда на основе геотермальной воды нефе-нольного класса для выделения и выращивания микобактерий [Текст] /З.А. Казиахмедов, Р.А. Нуратинов и др. //Вет. патология 2002 - № 1-2 — С. 170-172.

102. Кассич Ю.Я. Изучение сенсibiliзирующих и патогенных свойств атипичных микобактерий [Текст] /Ю.Я. Кассич// Ветеринария. – 1989. -№4. – С.13-15.

103. Кассич Ю.Я. Туберкулез животных и меры борьбы с ним [Текст]/ Кассич Ю.А., Борзиак А.Т., Кочмарский А.Ф. и др./-/Киев. – Урожай.- 1990 - 304с.

104. Качанова С.П. Меры борьбы и профилактики туберкулеза крупного рогатого скота [Текст]/С.П. Качанова// Ветеринария. –1987. –8. – С.67-69.

105. Касымбекова Г.Н. Применение электрофореза для концентрации и выделения микобактерий туберкулеза [Текст] /Г.Н. Касымбекова А.Н. Байгазанов //Научный журнал министерства образования, культуры и здравоохранения РК — Алматы: «Поиск», 2003.-№ 4(2).- С. 67-69.

106. Керимжанова Б.Ф. Метод постановки первичного диагноза на туберкулеза животных [Текст] /Б.Ф. Керимжанова, А.С. Жумашев, С.Д. Басыбеков //Свидетельство на объект интеллектуальной собственности. АИС НПВ РК.-№ 157 1994.

107. Керимжанова Б.Ф. Постановка первичного диагноза на туберкулез крупного рогатого скота [Текст] / Б.Ф. Керимжанова, А.С. Жумаш, В.А. Федченко, С.Д. Басыбеков, Б.Н. Шакенов и др. //Рекомендации. Алматы, 1995. – ГУВ МСХ РК— 8 с.
108. Кирилук Д. А. Выживаемость микобактерий туберкулеза птиц на сочных кормах [Текст] /Д.А. Кирилук, Х.Х. Абдулин //Профилактика туберкулеза крупного рогатого скота: Сб. науч. тр.— Казань, 1984 С. 21-25.
109. Ковалев Г.К. О дифференциации микобактерий туберкулеза [Текст] /Г.К. Ковалев //Ветеринария.- 1984.-№ 3- С. 72-73.
110. Костюк В.В. ПЦР при контроле благополучия скота по туберкулезу [Текст] / В.В. Костюк // Ветеринарная патология.-2004.-№1-2(9).1. С.105-107.
111. Козлицина Т.И. Генетические процессы у микобактерий [Текст] / Т.И. Козулицина, Н.В. Козлова // Пробл. туб.-1983.-№11.-С.61-67.
112. Кокуричев П.И. Патологоанатомическая диагностика болезней крупного рогатого скота [Текст] / П.И. Кокуричев, Н.А. Налетов //М. Агропромиздат. -1987. -С. -83-87.
113. Колоскова Э.Л. Патоморфологические изменения у животных, зараженными разными видами микобактерий. [Текст] Автореф. дис. канд. вет. наук: 16.00.03/ Э.Л. Колоскова// ВИЭВ.-М. - 2007.-22с.
114. Колычев Н.М. Индикация и обезвреживание микобактерий туберкулеза во внешней среде. [Текст] Монография / Н.М. Колычев.- Омск. 1992.-302с.
115. Колычев Н.М. Атипичные микобактерии показатель качества дезинфекции [Текст]/Н.М. Колычев //Ветеринария. -1982. -№7. –С.22-24.
116. Коромыслов Г.Ф. Разработка программ профилактики и ликвидации [Текст]/ Г.Ф. Коромыслов//Науч.тр. наиболее опасных болезней животных. ВИЭВ. - Т55,М. -1982. –С3-10.
117. Костюк В.В. ПЦР при контроле благополучия скота по туберкулезу [Текст] / В.В. Костюк // Ветеринарная патология.-2004.-№1-2(9).1. С.105-107.

118. Конопаткин А.А. Эпизоотология и инфекционные болезни [Текст]/А.А. Конопаткин// Москва. «Колос» -1993. -687 с.
119. Коронелли Т.В. Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов [Текст] /Т.В. Коронелли//Успехи микробиологии. - 1977. - №12. –С.164-189.
120. Куварин А.С. Иммуный статус у животных, инфицированных различными видами микобактерий [Текст] /А.С. Куварин: Автореф. . дис. канд. вет. наук. Новосибирск. -2005.- 19 с.
121. Кузин А.И. Применение внутривенной туберкулиновой пробы при диагностике туберкулеза КРС [Текст] / А.И. Кузин, Р.А. Нуратинов. //Бюлл. ВИЭВ. -1987. –Вып. 64. – С23-24.
122. Кузин А.И. Значение серологических методов в диагностике туберкулеза КРС [Текст] / А.И.Кузин , Н.П.Овдиенко //Бюлл. ВИЭВ. – 1988. –Вып.65. –С48-51.
123. Кузин А.И. Вопросы диагностики туберкулеза крупного рогатого скота [Текст] / А.И. Кузин, Л.К. Семина// Ветеринарная патология.- 2004.- № 1-2 (9).-С.48.
124. Козлов В.С. Биологические свойства микобактерий разных видов, выделенных из почвы [Текст] /В.С. Козлов// Проблемы туберкулеза. – 1982. –3. –С.65-68.
125. Козло П.Г. Дикий кабан [Текст] /П.Г. Козло// Минск. –Урожай.- 1975. –223с.
126. Коронелли Т.В. Липиды микобактерии и родственных микроорганизмов [Текст] /Т.В. Коронелли// – М. изд. Мос. Университета, 1984. -158с.
127. Кузин А.И. Оздоровление животноводческих хозяйств от туберкулеза [Текст] /А.И. Кузин// – Москва. «Россельхозиздат». -1987. – 139с.
128. Кузин А.И.К этиологии параллергических туберкулиновых реакций и динамике их возникновения у крупного рогатого скота [Текст]/ А.И. Кузин, Л.К. Семина// Науч.-практ. конф. Тез.докл.- Вологда, 1986.-С.8-9.

129. Кузин А.И. Туберкулез сельскохозяйственных животных и его профилактика [Текст] /А.И. Кузин// - М. - Росагропромиздат. -1992. -15с.
130. Кульберг А.Я. Молекулярная иммунология [Текст] /А.Я. Кульберг//– М. «Высшая школа». -1985. -287с.
131. Кусельтан И.В. Нокардиоз (инфекционный полиартрит) ягнят в Таджикистане [Текст] /И.В. Кусельтан//Тр. Тадж. НИВИ. – 1965. – Т.11.
132. Кучеров А.Л. Туберкулез среди социально-отягощенных групп населения [Текст] /А.Л. Кучеров// Проблемы туберкулеза. -1990. -№6. –С.60-23.
133. Кучеров А.Л. Рамки ВОЗ для эффективной борьбы с туберкулезом: приемлемы ли они для России [Текст] /А.Л. Кучеров// Туберкулез и экология. -1995. -№2. –С. 38-40.
134. Кучеров. А.Л. Внимание: туберкулёз [Текст] /А.Л. Кучеров// М; Народная библиотека. -2001. -122 с.
135. Лазовская А.Л. Патогенные и условнопатогенные микобактерии. [Текст] /А.Л. Лазовская, И.Н. Блохина// – Горький. -1976.
136. Лазовская А.Л. Таксономические аспекты микобактерии туберкулеза [Текст] /А.Л. Лазовская //Проб. Туб. – 1989. – Т.5. –С.68-71.
137. Лазовская А.Л. Борьба с туберкулезом крупного рогатого скота в хозяйствах НЗ РСФСР/ [Текст] А.Л. Лазовская, О.Ф. Рачкова, А.А. Бондаренко// Методологические рекомендации. – Нижний Новгород. -1992. –64с.
138. Лазовская А.Л. Идентификация культур микобактерий, выросших на среде с солицилатом натрия [Текст] /А.Л. Лазовская// Пробл. туберкулёза 1994. -№5. –С.45-46.
139. Лакин Г.Ф. Биометрия [Текст] /Г.Ф. Лакин// «Высшая школа» - 1980. –С.292
140. Лакман Э.Д. Иммунологические реакции при туберкулезе крупного рогатого скота и их значение в борьбе с этой инфекцией [Текст] / Э.Д. Лакман // Матер. Всес. научн. конф. по проблемам бруцеллеза и туберкулеза животных.- Омск, 1980.-С. 26-27.



141. Лакман Э.Д. РСК при диагностике туберкулеза КРС [Текст] /Э.Д. Лакман //Ветеринария. -1981. -№4. –С31-32.
142. Латышев А.С. О природе сомнительных и неспецифических реакций на туберкулин у КРС [Текст] /А.С.Латышев//Науч. труды Новосибирской НИВС. -1971. -4-С. 179-181.
143. Леви Д.Т. Оптимизация метода туберкулинодиагностики при использовании препарата ППД, БЦЖ [Текст] /Д.Т. Леви, Т.Б. Яблокова, Л.Н. Жукова// Пробл. туберкулёза. – 1987. -№12. – С.5-8.
144. Левина К.А. Опыт практического применения трех питательных сред для культивирования микобактерий туберкулеза [Текст] / К.А. Левина // Пробл. туб — 1988. — № 6. - С. 66-67.
145. Литвинов В.И. Антигены микобактерий туберкулеза [Текст] /В.И. Литвинов// Проблемы туберкулез. – 1989. -№40. –С.68-72.
146. Луницын В.Г. Туберкулез пантовых оленей [Текст] /В.Г. Луницын// Автореф. диссерт. докт. вет. наук. – Новосибирск. 1993.
147. Лысенко А.П. Разработка и внедрение новых методов диагностики и профилактики туберкулеза в Республике Беларусь [Текст]/А.П. Лысенко, А.Э. Высоцкий, Т.Н. Агеева//Ветеринарная патология. -2004.-№ 1-2.-С. 41-43.
148. Макрова Л.И. Контроль благополучия по туберкулезу поголовья крупного рогатого скота в хозяйствах республики Саха (Якутия) [Текст] // Ветеринарная патология.-2004.-№1-2(9).-С.74-76.
149. Макаров В.В. Ветеринарное здравоохранение и его значение в инфекционной патологии человека [Текст] /В.В. Макаров, А.А. Воробьёв// ЖМЭИ. –1999. -№4.–С.111-115.
150. Мандро Н.М. Особенности эпизоотического процесса туберкулеза сельскохозяйственных и диких животных и совершенствование методов его контроля [Текст] /Автореф. дис. докт. вет. наук: 16.00.03 // Н.М. Мандро; ИЭВСиДВ.- Новосибирск, 2001.- 40с.
151. Мандро Н.М. Моновидные аллергены и их значение о эпизоотической оценке стад КРС по туберкулезу. Автореф. канд. дисс. [Текст] /Н.М.Мандро // Новосибирск. -1987. –С. 21.

152. Мартма О.В. Атипичные микобактерии и их диагностическое и эпизоотическое значение при туберкулезе КРС [Текст] /О.В.Мартма. //Автореф. док.дисс.- Тарту. 1971.

153. Мартма О.В. Характеристика и патогенность для КРС микобактерии выделенных из торфа [Текст] /О.В. Мартма //Ветеринария. – 1976. - №5. – С. 35-38

154. Мартма О.В. Парааллергические реакции на туберкулин и их дифференциация [Текст] /О.В. Мартма, К.К. Тяхнас// Ветеринария. –1978. - №4. –С.35-38.

155. Мартма О.В. Современное состояние проблемы атипичных микобактерии [Текст] /Мартма О.В.//Ветеринария. -1982. – С. 22-24.

156. Мартма О.В. Комплексная дифференциация парааллергических туберкулиновых реакций [Текст] /О.В.Мартма, Х. Ёыгисор //Сб. науч. трудов Эстонской НИИЖиВ. 1982. - №53 – С. 46-53.

157. Мартма О.В. Патогенность и вирулентность различных видов микобактерий [Текст] /О.В. Мартма, Н.П. Овдиенко, А.В. Ткачѳв-Кузмин// В кн. Туберкулез сельскохозяйственных животных. – М. –Агропромиздат. - 1991. –С.28-32.

158. Маянский, А.Н. Микобактерии: туберкулез и микобактериозы [Текст] /А.Н. Маян-ский Нижний Новгород, Нижегородская Госмедакадемия, 2000 - 74 с.

159. Мирзоев Д.М. Совершенствование диагностики и системы мероприятий по профилактике и оздоровлению хозяйств от туберкулеза КРС [Текст] / Мирзоев Д.М. //Автореф. дисс. канд. вет. наук. -М. -1989. -19с.

160. Мирзоев Д.М. Сравнительная оценка однократного и двукратного введения туберкулина [Текст] / Мирзоев Д.М.//Сб. науч. трудов Тадж. НИВИ 1997-1998. -Душанбе. – С 68-70.

161. Михайлова К.И. Неспецифические реакции на туберкулин у КРС в благополучных по туберкулезу хозяйствах [Текст] /К.И.Михайлова // Труды Тадж. НИВИ. -1977.

162. Меджидов М.М. Разработка микротест-системы для идентификации коринебактерий// Разработка и производство препаратов в медицинской биотехнологии [Текст] / Меджидов М.М., Шабухова Т.С., Гриднева Н.И //Тезисы конф.-Махачкала. -1992. –С.77-78.

163. Мурашкина Г.С. Влияние эпизоотического неблагополучия на основные эпидемиологические показатели по туберкулезу [Текст] /Г.С. Мурашкина, А.С. Донченко// Проблемы туберкулёза. -1992. -№11-12. –С. 12-15.

164. Мотаев Б.Г. Эпизоотология и диагностика туберкулеза КРС в Таджикской ССР. Автореф. дисс. канд. вет. наук [Текст] / Б.Г.Мотаев// Душанбе. -1974. - 20 с.

165. Мосробяну И. Иммунобиология, иммунохимия, иммунопатология [Текст] / И.Мосробяну, Ш. Берчану // - Бухарест. -1975. -521с.

166. Найманов А.Х. Туберкулинизация КРС [Текст] / А.Х.Найманов //Ветеринария.-1980. -№6.- С.39-40.

167. Найманов А.Х. Значение дозы, объема, места введения ППД-туберкулина для млекопитающих при диагностике туберкулеза КРС [Текст] /А.Х. Найманов//Тез. докл. Всесоюзной конф. ВАСХНИЛ. - Омск. – 1980. – С.29-30

168. Найманов А.Х. Сравнительная изучение внутрикожной и глазной методов применения ППД-туберкулина для млекопитающих [Текст] /А.Х. Найманов //Ветеринария. – 1983. -№6.-С31.

169. Найманов А.Х. Применения диагностических тестов в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах [Текст] / А.Х. Найманов//Ветеринария.-1990.-№1.-С31-32.

170. Найманов А.Х. Сравнительное изучение внутрикожного и глазного методов применения ППД-туберкулина [Текст] /А.Х.Найманов//Бюллетень ВИЭВ. – Т43-1993.-С.12-16.

171. Найманов А.Х. Реакция клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном и естественном заражение туберкулезом овец [Текст]

/А.Х. Найманов, Н.П. Овдиенко, Л.Н.Черноусова //Науч. тр. ВНИИБТЖ. -Омск. -2000. –С.112-119.

172. Найманов А.Х., Овдиенко Н.П. Современные задачи в борьбе с туберкулезом КРС [Текст] / А.Х.Найманов, Н.П.Овдиенко//Ветинформ.-2002. -№4.-С8-9.

173. Найманов А.Х. Проблемы диагностики и профилактики туберкулеза КРС современных условиях [Текст] / А.Х. Найманов // Ветеринарная патология. -2004. -№1 -2(9). –С.18-23.

174. Найманов А.Х. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота в индивидуальных хозяйствах [Текст] /А.Х.Найманов, Н.П. Овдиенко, Н.П.Помыканов// Мат. международной научно-прак. конф. «Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных.» Москва. – 2006. –С.297-302.

175. Найманов А.Х. Сравнительное изучение симультанной пробы с ППД-туберкулином для млекопитающих и птиц с симультанной пробой с ППД-туберкулином для млекопитающих и КАМ [Текст] /А.Х.Найманов, Н.П.Овдиенко, Н.П.Помыканов// Мат. международной научно-прак. конф. «Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных.». Москва. – 2006. –С.303-305.

176. Нахмансон В.М. Дифференциальная диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных [Текст] /В.Н. Нахмансон,Л.Г. Бурба// –Москва: «Росагропромиздат». -1990.

177. Нестеренко О.А. Хемотаксономические признаки бактерий рода *Nocardia*, изолированных из почв Украины [Текст] /О.А. Нестеренко// Журнал микробиологии. – 1976. –Т.XLV. –В5. – С.831-837.

178. Нестеренко О.А. Хемотаксономические признаки некоторых коринеподобных бактерий и группы «*rhodochrous*» [Текст] /О.А. Нестеренко, Т.М. Ногина, Е.И. Квасников// Микробиология. –1978. –47. -№6. –С.1055-1062.

179. Нестеренко О.А. Микроорганизмы рода *Nocardia* и группы «Rhodahrous» в почвах Украинской ССР [Текст] /О.А. Нестеренко// 1978. Микроб. - Т. XLVII в 5. -С.866-870.

180. Нестеренко О.А. Жирные кислоты быстрорастущих микобактерий и родственных им микроорганизмов [Текст] /О.А. Нестеренко, Л.П. Панченко, Л.В. Андреев// Микобактериологич. журнал. –1980. –42. -№5. –С. 556-561.

181. Нестеренко О.А. Систематика нокардоподобных и коринеподобных бактерий [Текст] /О.А. Нестеренко// Автореф. диссерт. докт. биол. наук. – Киев. -1982. –42с.

182. Нестеренко О.А. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии. [Текст] /О.А. Нестеренко// Киев. Наукова Думка. -1985. -333 с.

183. Нечваль И.Т. К вопросу дифференциации туберкулиновых реакций [Текст] /И.Т.Нечвал, Б.И.Буряк, С.И. Кованда, В.И.Свиридов //Ветеринария, -1973. -№6 –С.36-52.

184. Новак Д.Д. О диагностике туберкулеза и дифференциации туберкулиновых реакций [Текст] /Д.Д. Новак //Ветеринария. -1973. -№4. - С48-49.

185. Новак Д.Д. Туберкулез сельскохозяйственных животных [Текст] /Д.Д. Новак//Алма-Ата. –Кайнар. -1977.- 142с.

186. Новак Д.Д. Туберкулез крупного рогатого скота [Текст] /Д.Д. Новак //Алма-Ата. –Кайнар. -1984. -160с.

187. Нуратинов Р.А. Внутривенная туберкулиновая проба в диагностике туберкулеза КРС [Текст] /Р.А. Нуратинов// Тез. док. III республ. научно-практич. конференция. Гродно. –1987. с.89.

188. Нуратинов Р.А. Выявление больного туберкулезом КРС в состоянии анергии к туберкулину [Текст] / Р.А.Нуратинов// Дисс. канд. вет. наук. Москва. -1987.-140с.

189. Нуратинов Р.А. К вопросу диагностики туберкулеза КРС[Текст] /Р.А.Нуратинов //Ветеринария. -1990. -№8. –С.20-21.

190. Нуратинов Р.А. Способ получения биологически активного белка из культуральной жидкости бактерий N. Asteroids [Текст] /Р.А.Нуратинов //

Докл. 4-ой региональной науч. конф. « Химики Северного Кавказа производству». Махачкала. -1996. – С.133.

191. Нуратинов Р.А. Изучение сенсibiliзирующей способности к туберкулину организма опытных животных микроорганизмами рода *Nocardium* [Текст] /Р.А.Нуратинов, М.Н.Магомедов //Ветеринария. -1996. - №5. –С.27-29.

192. Нуратинов Р.А. Экспериментальное обоснование неспецифической сенсibiliзации к туберкулину кроликов зараженных бактериями рода *Rhodococcus* [Текст] /Р.А.Нуратинов, К.Р.Ургуев //Тез. докл. междунар. конф. – Махачкала.-1997. – С.49-50.

193. Нуратинов Р.А. Туберкулез крупного рогатого скота в республиках Северного Кавказа и Калмыкии (эпизоотология, проблемы дифференциальной диагностики и меры борьбы) [Текст] /Р.А. Нуратинов// Автореф. диссерт. докт. вет. наук.- Москва. -1998. –350с.

194. Нуратинов Р.А. Некоторые вопросы экологии микобактерий и родственных микроорганизмов [Текст] /Р.А.Нуратинов//Ветеринария. -1999. -№9. –С.27-30.

195. Нуратинов Р.А. Об аллергической реакции при диагностике туберкулеза [Текст] /Р.А. Нуратинов, М.О.Баратов и др. //Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. -2001. -№3. –С.69-72.

196. Нуратинов Р.А.Изучение причин парааллергии к туберкулину [Текст] /Р.А.Нуратинов, И.Э.Эфендиева //ЖМЭИ. -2001. -№1. –С50-53.

197. Нуратинов Р.А., Баратов М.О. Аллергические реакции на туберкулин у больного актиномикозом КРС [Текст] /Р.А. Нуратинов, М.О. Баратов //Вестник ветеринарии. -2001. -№2. –С.3-6.

198. Нуратинов Р.А. Кислотоустойчивые микроорганизмы – микобактерии, нокардии, родококки: химический состав, биологические свойства, антигенная структура [Текст] /Р.А.Нуратинов, М.О.Баратов и др. //Проблемы туберкулеза.-2001. №5. –С.54-58.

199. Нуратинов Р.А. и др. Совершенствование бактериологической диагностики туберкулеза [Текст] / Р.А.Нуратинов//Проблемы туберкулеза. - 2002.-№5. – С.49-52.
200. Нуратинов Р.А. Хемотоксономические признаки бактерий родов *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, изолированных из объектов внешней среды в РД [Текст] /Р.А.Нуратинов, М.М.Халималов // - ЖМЭИ. -2004.
201. Нуратинов Р.А. Туберкулез [Текст] / Р.А.Нуратинов, М.Г.Газимагомедов// – Махачкала: «Планета – Дагестан». – 2009 -336с.
202. Овдиенко Н.П. Парааллергические реакции на туберкулин у крупного рогатого скота, инфицированного микобактериями паратуберкулеза [Текст] /Н.П. Овдиенко// Тр. ВИЭВ. –1985. –9. –С.15-19.
203. Овдиенко Н.П. Профилактика и ликвидация туберкулеза крупного рогатого скота [Текст] /Н.П. Овдиенко// Ветеринария. -1986. –9. –С.15-20.
204. Овдиенко Н.П. О кратности введения туберкулина КРС [Текст] / Овдиенко Н.П., Щуревский В.Е., Найманов А.Х. и др. //Ветеринария. -1987. - №8 С.29-33.
205. Овдиенко Н.П. Пальпебральная проба при туберкулезе КРС [Текст] / Овдиенко Н.П., Нуратинов Р.А., Найманов А.Х., Кочаров П.Э// Ветеринария. -1987. -№5 –С.32-33.
206. Овдиенко Н.П., Козин А.И. Дифференциация неспецифических реакций на туберкулин для млекопитающих у КРС [Текст] /Н.П. Овдиенко, А.И.Козин // Тезисы докл. – Омск. -1980 –С. -33.
207. Овдиенко Н.П. Профилактика и ликвидация туберкулеза [Текст] /Н.П.Овдиенко// Ветеринария – 1989 -№9 –С15-19.
208. Овдиенко Н.П. Выявление микобактерий и чувствительность крупного рогатого скота к туберкулинам [Текст] /Н.П. Овдиенко // Ветеринария. 1989. –9. –С.26-28.
209. Овдиенко Н.П. Эпизоотология и диагностика туберкулеза крупного рогатого скота в условиях интенсификации животноводства [Текст] /Н.П. Овдиенко// Автореф. диссерт. докт. вет. наук. М. -1990. –490с.

210. Овдиенко Н.П. видовая принадлежность микобактерий, выделяемых от КРС и из объектов внешней среды [Текст] / Н.П.Овдиенко, В.И.Косенко, Б.И.Антонов и др. // Проблемы туберкулеза. – 1990. -№2. – С.46-48.

211. Овдиенко Н.П. Туберкулез сельскохозяйственных животных. [Текст] /Н.П. Овдиенко, В.П. Урбан, В.П. Шишков// – М. Агропромиздат. -1991. –С. 85-135.

212. Овдиенко Н.П. Никакого перемирия в борьбе с туберкулезом [Текст] / Н.П.Овдиенко, А.Х.Найманов, В.А.Видерников// Ветеринарная газета. - 2002.-№6.-Ц-45

213. Овдиенко Н.П. Эпизоотическая обстановка по туберкулезу КРС в зарубежных странах в начале XXI века [Текст] /Н.П. Овдиенко, А.Х.Найманов, И.В.Солодова //Ветеринарная патология. – 2004. -№1-2(9).- С.51-54.

214. Покровский В.И. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке [Текст] / В.И. Покровский, Г.Г.Онищенко, Б.Л. Черкасский,- М.: Медицина.- 2003. -С. -307-318.

215. Прокопьева Н.И. Экология микобактерий в условиях Якутии [Текст] / Н.И. Прокопьева // Труды ВНИИВиМ. Покров -2003.-С.252-257.

216. Прокопьева Н.И. Изучение природы аллергических реакций у крупного рогатого скота благополучных по туберкулезу стад [Текст] / Н.И. Прокопьева // Ветеринарная патология.- 2004.- № 1-2 (9).-С. 134-136.

217. Пушкарева В.И. Потенциальные хозяева и пути циркуляции патогенных бактерий в водных (почвенных) экосистемах [Текст] / В.И. Пушкарева, Б.В. Боев //Эпидемические аспекты экологии бактерий. - М., «Фармарус-принт». -1997. - С. - 80-109.

218. Пунга В.В. Выявление туберкулеза в современных условиях. [Текст] / Русский медицинский журнал. Пульмонология// - 1998. - т.6. - №17. - С.1130-1131.

219. Прозоровский С.В. L-формы бактерий [Текст] /С.В. Прозоровский, Л.Н. Кац, Г.Я. Каган// – М. Медицина. -1981. –237с.



220. Петров Р.В. Т и В лимфоциты: генез и специфические рецепторы [Текст]/ Петров Р.В., Захарова Л.А. // Итоги науки и техники. Общие вопросы патологии. -1976. –Т.4. –С.7-35.

221. Ридала В. О патологоанатомических изменениях у кур, вызванных изолированными от скота атипичными микобактериями [Текст] /В. Ридала, К. Тянос// Сб. науч. тр. Эстонского НИИ животн. и ветерин. – Таллин. 1974. –32. –С. 86-87.

222. Ротов В.И. Серологические реакции при исследовании коров на туберкулез [Текст] / В.И. Ротов, С.В. Кныш, В.П. Дорожко, П.А. Нарожный // Сб. Ветеринария.- Киев, 1975.-Вып. 42.-С.3-6.

223. Ротов В.И. Туберкулез сельскохозяйственных животных [Текст]/В.И.Ротов, П.И.Кокуричев, П.Е. Савченко // - Киев. – Урожай. -1973 - 384с.

224. Ротов В.И. Туберкулез сельскохозяйственных животных [Текст] /В.И. Ротов// - Киев. – Урожай. -1978. –237с.

225. Руманчик И.И. Особенности аллергических исследований на туберкулез крупного рогатого скота [Текст] / И.И. Румачик, А.А. Солонко // Ветеринария.-1984.-№ 9.- С. 30-31.

226. Румачик И.И. Культуральное выделение микобактерий [Текст] /И.И. Румачик// Тез. докл. III республ. науч. – практ. конф. / «Современные проблемы проф. зоонозных болезней и пути их решения». – Гродно. -1987. – С. 80-81.

227. Савов Н. Об аллергических туберкулиновых реакциях и патологических изменениях у крупного рогатого скота от которых выделены различные типы микобактерий [Текст] /Н. Савов// Изв. центр. вет. инст. заразных и паразитарных болезни. –1961. –кн. 1.Сборник материалов II(XII) съезда фтизиатров. – Саратов. 1994. -315с.

228. Синева С.Г. Туберкулез у животноводов в регионах с различным уровнем поражённости крупного рогатого скота [Текст] /С.Г. Синева// Тезисы докладов зонального совещания. – Новосибирск. 1987. – С.26-27.

229. Смирнов, А.Н. Современные проблемы диагностики туберкулеза животных [Текст] // Ветеринарная патология.- 2004.-№1-2 (9).-С. 10-13.
230. Смолнинов Ю.И. Экономический ущерб от туберкулеза крупного рогатого скота в России[Текст] / Ю.И. Смолянинов, Н.А. Донченко, С.Ю. Смолянинов, В.Ф. Бордюг, Н.Н. Кошеев // Ветеринарная патология.-2005.-№1(12).-С.104-112.
231. Спиридонова Г.Г. Значение некоторых диагностических тестов и дифференциации туберкулиновых реакций [Текст] /Спиридонова Г.Г.// Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве. Новосибирск. -1999. –С. 273-275.
232. Семенова Г.А. Показатели неспецифических реакций на различные туберкулины у КРС [Текст]/ Г.А.Семенова //Тезисы Всесоюз. науч.-тех. конф молодых ученых. -1985. –С.-221-223.
233. Сысоев В.Н. Дифференциация парааллергических и специфических туберкулиновых реакций у КРС: Автореф, дисс. канд. вет. наук [Текст]/ В.Н.Сысоев // - Новосибирск. -1985. –С.20.
234. Талер Л.А. Совершенствование лабораторных методов выделения и идентификации микобактерий туберкулеза у крупного рогатого скота [Текст]/ Автореф. дис. канд. вет. наук/Л.А. Талер. - Омск, 1995.-19с.
235. Тихомирова М.Л. Проблемы диагностики бычьего туберкулеза у крупного рогатого скота. [Текст] / А.Л. Лазовская, Д.Т. Леви // Актуальные проблемы фтизиопульмонологии. - Нижний Новгород. - 1991. - С. 94-101.
236. Ткачев – Кузмин А.В. Роль некоторых видов атипичных микобактерий в сенсibilизации КРС к туберкулину. – Автореф. дисс. канд. вет. наук [Текст]/А.В.Ткачев – Кузмин //-М. -1982. –С.6-12.
237. Ткаченко А.А. Парааллергические реакции на туберкулин [Текст]/А.А.Ткаченко //Ветеринария. -1985. -№4. –С.29.
238. Толстенко Н.Г. Патогенные свойства некоторых видов микобактерий, выделенных от животных и объектов внешней среды [Текст] Автореф. дис. . канд вет. наук: 16.00.03/ Н.Г. Толстенко// ВИЭВ.-М., 2006.-27с.

239. Третьяков А.Д. Задачи ветеринарной службы по профилактике зооантропонозов [Текст]/А.Д.Третьяков// Современные инфекции. -1981. –С. 4-6.
240. Трубкин А.И. Свойства микобактерий, выделенных от животных, реагирующих на туберкулин [Текст] // Ветеринария.-2005.-№11.-С.23-2
241. Тунгусова О.С. Молекулярная генетика микобактерий туберкулеза [Текст] / О.С. Тунгусова, А.О.Марьяндышев // Проблемы туберкулеза и болезней легких. -2003.-№2.-С.43-45.
242. Урбан В.П. Аллергическая диагностика туберкулеза [Текст] /В.П.Урбан, М.М.Широбокова, Ю.Ю.Данко//Профилактика и ликвидация заразных болезней животных. – Л.-1985. –С.80-85.
243. Урбан В.П. Микобактериозы у КРС [Текст ]/В.П.Урбан, М.М. Широбокова, Ю.Ю.Данко, В.А. Песков // Сб. науч. трудов Ленинградского вет. института. -1986. –С.104-110.
244. Урбан В.П. О специфичности туберкулиновой пробы при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота [Текст]/В.П. Урбан// Мат. науч. конф. ЛВИ. – 1971. – Вып. 5. –С.28-29.
245. Урбан В.П. Эпизоотическая вспышка туберкулеза овец [Текст]/В.П. Урбан, М.М. Широкобокова, Ю.Ю. Данко, Т.В. Вяль// Сб. науч. тр. ЛВИ. Л., 1980. –Вып. 63. –С.104-109.
246. Урбан В.П. Принципы аллергических реакций на внутрикожное введение туберкулина у крупного рогатого скота в благополучных по туберкулезу хозяйствах [Текст]/В.П. Урбан// Сб. н.тр. ЛВИ. –1988. –С.47-48.
247. Урбан В.П. Современные проблемы борьбы с туберкулезом животных [Текст]/В.П. Урбан//Тез. док. Произ. Конф. «100 лет Курской биофабрике». - Курск.- 1996. –С.326-328.
248. Фрадкин В.А. Диагностические и лечебные аллергены [Текст]/В.А. Фрадкин// – М. -Медицина. -1990. -255 с.
249. Федосеев В.С. Л – трансформация микобактерий [Текст] /В.С. Федосеев, И.Н. Рубцова, Н.Г. Куриленко// Ветеринария. –1985. -№12. –С.30-32.

250. Федосеев В.С. Роль скота и птицы личных подсобных хозяйств в эпизоотологии и эпидемиологии туберкулеза [Текст] /В.С. Федосеев// Организация противотуберкулезных мероприятий на эпизоотически неблагополучных территориях / Тезисы докладов зон. совещ. – 1987. –С.32-33.

251. Федосеев В.С. Микобактерионосительство у животных как резервуар и источник возбудителя [Текст] / В.С. Федосеев, И.Н. Рубцова, Н.Г. Кириленко и др. // Труды ИЭВСиДВ.- Новосибирск. – 1986. -С.51-56.

252. Фоминов И.П. Профилактика и борьба с туберкулезом рогатого скота в Южном Поволжье в новых условиях хозяйствования [Текст] /И.П. Фоминов// Автореф. дис... канд. вет. наук. – М. -1997. –20с.

253. Фродкин В.А. Диагностические и лечебные аллергены [Текст] /В.А. Фродкин// – М. -Медицина. –1990. –255с.

254. Хабибов А.Х. Параспецифические реакции на туберкулин и зоонозные проблемы племтелок завезенных в республику Таджикистан [Текст]/А.Х. Хабибов// Тез. науч произв. конф. « Актуальные проблемы сельскохозяйственных наук». - Душанбе. -1999. –С. 6.

255. Хабибов А.Х. Влияние климатогеографических факторов на диагностику туберкулеза [Текст] /А.Х.Хабибов//Автореф. дисс. доктора вет наук. Душанбе . -2000 . – 49с.

256. Харитонов М.В. О дифференциации специфических реакций на туберкулин от неспецифических [Текст]/М.В. Харитонов// Ветеринария. - 1983. -№1. –С.30-31.

257. Хайкин Б.Я. Зональные особенности эпизоотического процесса при туберкулезе КРС в отдельных областях Урала и Западной Сибири. Хайкин [Текст]/Б.Я.Зубакин // Актуальные вопросы эпизоотологии и меры борьбы с туберкулезом животных; Межвузовский сб. науч. тр. – Казань. -1989. – С.19-24.

258. Хазипов Н.З. Туберкулез крупного рогатого скота [Текст] / Н.З. Хазипов, М.А.Сафин, Г.З.Идрисов // – М. «Агропромиздат». -1985. – 126 с.

259. Хоменко А.Г. Туберкулез органов дыхания [Текст]/А.Г.Хоменко//– М. «Медицина». -1988. -576с.
260. Ходун М.М. Выделение атипичных микобактерий от нереагирующих на туберкулин животных [Текст] /М.М. Ходун, Л.В. Погуляева, Л.А. Ильиных// Ветеринария. –1990. -№6. –С.29-30.
261. Чепик Г.В. Значение кратности введения сухого очищенного (ППД) туберкулина для млекопитающих и время учета аллергических реакций [Текст] /Г.В. Чепик// Тез. докл. респуб. научно-произв. конф. по туберкулину. -1973. –С. 39-40.
262. Чепик Г.Ф. О групповой специфичности аллергии у животных инфицированных различными микобактериями [Текст] /Г.Ф.Чепик // Труды - Бел НИИЭВ. -1978.
263. Чепик Г.Ф. Эффективности пороговых доз аллергенов для дифференциальной диагностики туберкулеза КРС [Текст]/Г.Ф. Чепик //Достижения вет. науки и передового опыта животноводству. – Минск. - 1978. Вып. 4.-С. 6-7.
264. Черноградский Бактериовыделение при туберкулезе в условиях Якутии [Текст] /Черноградский// В кн.: Вопросы адаптации человека на Севере. – Якутск. -1990. –С. 11-13.
265. Чурбаков Н.К. Псевдоаллергические туберкулиновые реакции к.р.с. проявляемые в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах [ Текст] /Н.К.Чурбаков // Труды Целиноградского с-х института. -1982. 50 -С.76-78.
266. Шаров А.Н. К вопросу о дифференциации специфических и парааллергических реакций на туберкулин [Текст]/А.Н. Шаров// Автореф. Диссерт. канд. вет. наук. – М. -1970. –32 с.
267. Шаров В.А. Туберкулез [Текст]/В.А. Шаров// Болезни овец и коз. – М. Колос. -1973. –С. 166-171.
268. Шаров. А.Н., Комплексный аллерген из атипичных микобактерий [Текст]/Шаров. А.Н., Плотников А.С. //Ветеринария. -1980. -№-5. –С. 41-43.
269. Шаров А.Н. К вопросу диагностики туберкулеза [Текст] /А.Н.Шаров. //Ветеринария. -1982. -№9. с. 16-17.

270. Шаров А.Н. Аллергическая диагностика туберкулеза животных и повышение её эффективности [Текст] /А.Н. Шаров// Автореф. диссерт. докт. вет. наук. М. -1989. – 37с.

271. Шишков В.П. Туберкулез животных, методы диагностики и профилактики [Текст] /Шишков В.П. Ткачев-Кузьмин А.В., Кочанов С.П. //Обзорная информация. – М. -1986. -43С.

272. Шкиль Н.А. Критерии оценки интенсивности проявления эпизоотического процесса туберкулеза крупного рогатого скота // Эпизоотология, диагностика, профилактика и меры борьбы с инфекционными болезнями животных [Текст] /Н.А. Шкиль, А.С. Донченко// Сб. науч. тр. РАСХН. Сиб. отд. ИЭВС и ДВ. - Новосибирск. -1992. –С. 20-23.

273. Шуревский В.Е. Диагностика и организация борьбы с туберкулезом сельскохозяйственных животных [Текст] /В.Е.Шуревский //Проблемы зоогигиены и ветеринарной санитарии на животноводческих фермах. –М. -1970. –С. 199-205.

274. Шуревский В.Е. Методы диагностики, оздоровления и профилактики туберкулеза КРС [Текст] /В.Е.Шуревский //Сб. науч. тр. Док. н. к, вет. ин-та. –Т. -№14. -1982. –С. 8-12.

275. Шуревский В.Е. Быстрорастущие атипичные микобактерии КРС [Текст] /В.Е.Шуревский, Н.П.Овдиенко, А.М.Кадочкин, В.П.Кудяков //Ветеринария. -1984. -№-9. –С. 29.

276. Шуревский В.Е. Атипичные микобактерии и их патогенность для сельскохозяйственных животных [Текст] /В.Е.Шуревский, Н.П.Овдиенко, А.М.Кадочкин //Ветеринария. - 1995. -№4. -С. 32-35.

277. Шуревский В.Е., Аллергическая диагностика туберкулеза КРС [Текст] /Шуревский В.Е., Овдиенко Н.П., Найманов А.Х и др.//Пути ликвидации инфекционных инвазионных болезней сельскохозяйственных животных. Сб. науч. тр. – Новосибирск. -1985.-С. 12-13.

278. Шуревский В.Е. Туберкулез животных и меры борьбы с ним [Текст] /В.Е. Шуревский, А.Н. Шаров, Ю.Я. Кассич, О.В. Мартма// Диагностика туберкулеза. - М. -1990. –С. 76-145.

279. Юдин Г.А. Причины, распространение, дифференциация и профилактика неспецифических реакций на туберкулин [Текст] / Г.А. Юдин // Ветеринария. -1987.-№12.-С.29-32.

280. Юдин Г.А. О псевдоаллергических реакциях на туберкулин [Текст] /Г.А. Юдин// Ветеринария. – 1981. -№ –С. 29-32.

281. Юдин Г.А. Совершенствование диагностики туберкулеза животных [Текст] /Г.А. Юдин// Ветеринария. – 1990. -№6. –С. 27-28.

282. Юдин Г.А. Причины, распространение, дифференциация и профилактика неспецифических реакций на туберкулин [Текст] // Ветеринария. 1987. - №12. -С. 29-32.

283. Ярбаев Н. Течение туберкулеза КРС в различных зонах Таджикистана [Текст]/ Н.Ярбаев, Д.М.Мирзоев //Совершенствование мер борьбы с болезнями сельскохозяйственных животных в Таджикистане. Сб. науч. работ. – Душанбе. -1988. С.-4-8.

284. Ярбаев Н. Туберкулез КРС. Обзорная информация [Текст] /Н.Ярбаев, А.Х.Хабибов.// – Душанбе. -1989. -32 С.

285. Ярбаев Н. Туберкулез крупного рогатого скота в республике Таджикистан [Текст] /Н. Ярбаев// Автореф. диссерт. докт.вет. наук. – Новосибирск. -1993. -38 с.

286. Ярных В.С. Санитарные мероприятия в системе противозoonотической защиты [Текст] /В.С. Ярных// Ветеринария. –1985. – 11. – С.26-30.

287. Asselineau C. Trehalose – containing glycolipids / Progr. Chem. /С. Asselintsu, Z. Asselinesu// Fats other Lipids. – 1978. -16. –Р. 59-99.

288. Azuma J. Polisaccharides of Mycobacterium bovis Ushi 10, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium, phlei and atypical mycobacterium Pl /J. Aruma, M. Ajisaka, J. Jamancus// Infect and Jmmun// –1980. –2. -№2. –Р.347-349.

289. Azuma J. The micolic acida of Mycobacterium rhodochrous and Nocarodia corallina /J. Azuma// Biken Z. –1994. –17. -№1. –Р. 1-9.

290. Awad F.J. The interrelationship between tuberculosis and bovine fareg /F.J. Awad// Z. comp. Path. a. Therap. 1988. –68. –N13. –P. 324-330.
291. Awad F.J. M.R.C.V.S. Studies on Bovine Nocardiosis with Particular Reference to its Interference in the Interpretation of the Results of Tuberculin testing /F.J. Awad// XVII Welt tierarzrekongress. Kongresberichte Proceedings Rapports Actas. –Hannover 14-21 avgust. 2001. –N.1. –P. 465-471.
292. Baess I., Nansa B. Determination of genome size and base ratio on deoxiribonucleic acid from Mycobacteria /I. Baess, B. Nansa// Acta pathol et microbiol scand. –1998. –86. –N5. –P309-312.
293. Barksdale L, Mycobacterium /L. Barksdale, K.S. Kim// Bacteriol Revs. –2007. –41. N2. –P217-372.
294. Barrow W.W. Peptidoglycolipid nature of the superficial cell wall sheath of smooth – colony – forming mycobacteria /W.W. Barrow, B.P.Ullom, P.I. Brennan // Z. Bacterid. –1980. -144. –N2. –P.814-822.
295. Beaman B.L. Structural and biochemical alterations of Nocardia asteroides cell walls during its growth cycle /B.L. Beaman// Z. Bacteriol. –1995. –123. –N5. –P. 1235-1253.
296. Beaman B.L. Possible mechanisms of nocardial pathogenesis / The biology of the nocardiae. London etc. /B.L. Beaman// Acad press –1996. –P. 386-417.
297. Beaman B.L. Cell wall modification resultinr from in vitro induction of L-phase variants of Nocardia asteroides /B.L. Beaman, A.L. Bourgeois, S.E. Moring // Z. Bacteriol –2001. 0N2. –P. 600-609.
298. Beerwerth W. Mikobacterium in Viehtranken und Oberflachengewasser \W. Beerwerth// Dtsch. Tierazzt. Wschr –2003. –80. –398-401.
299. Becker B. Appl Microbiol /B. Becker// –1984. –12. –P421.
300. Becol O. Bernstand S. Scand J. Infect. Dis /S. Bernstand// –1974. –V.6. –P241.
301. Boylen C.W. The survival of coryneform bacteria diring periods os prolonged nitrient starvarion /C.W. Boylen, M.H. Mulks// Z. Gen. Microbiol. –2000. –105. –N2. –P.323-334.



302. Bordet C. Cell walls of nocardial and related acrinomycetes: identical of the genus *Nocardia* by cell walls analysis /C. Bordet// *Z. syst Bacteriol* –2008. –22. –N4 –P.251-259.
303. Closs O. *Scand Z. immunol* /O. Closs, M. Harboe, N.H. Axelsen//. – 1980. –Vol. 12. N3. –P249-263.
304. Collins M.D. Lipids in the classification and identification of coryneform bacteria containing peptidoglycans based on 2,4-diaminobutyric acid /M.D.Collins, D. Jones// *Z. Appl Bacteriol* –1980. –48. –N3. –P459-470.
305. Collins M.D. Fatty acid composition of some mycolic acid – containing coryneform bacteria. /M.D. Collins, M. Goodfellow, D.E. Minnikin// *Z. Gen. Microbiol* –1982. –128. –N11. –P2503-2509.
306. Corner Z. The duration of the response of cattle to inoculation with atypical mycobacteria /Z. Corner// *Austral. Veter. J.* –1981. –57. N5. –P.216-219.
307. Cummins C.S. The chemical composition of the cell wall in some gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. /C.S.Cummins, H. Harris // *Z. Gen. Microbiol.* –1996. –14. -N3. –P583-600.
308. Cummins C.S. Studies on the cell-wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups /C.S. Cummins, H. Harris// *Z. Gen. Microbiol* –1990. –18. –N1. –P173-180.
309. Den Dooren de Jong L.E. Ueber protaminophage Bakterien // *Zbl. Bacteriol., Parasitenk., Infektionskrankg und Hyg Abt.* // -1978. –71. N8/14 – S193-232.
310. Emeruwa A.S. Isolation and metabolism of glycogen and poly-beta-hydroxybutyrate in *Nocardia* /A.S. Emeruwa// *Ann Microbiol D. (Inst Pasteur)*. –2007. –132. –N1. –P.13-21.
311. Fraeser D.W. Bacteria newly recognized as nosocomial pathogens /D.W. Fraeser// *Amer. J. Med.* –1997. –70. N2. –P. 432-438.
312. Galati P. Dell'importanza di alcune blastomicosi nel determinismo di reazioni eteroallergiche alla tubercolina nei bovini /P. Galati, S. Damiano// *Nuova veter.* –2001. –50. N1/3. –P. 96-101.

313. Goren M.B. Mycobacterial lipids: selected topics. /M.B. Goren// Bacteriol. Revs. –2009. –36. –N1. –P.33-36.
314. Goren M.B. Some observations on mycobacterial acidfastness. /M.B. Goren, M. Cerneh, O.Brokl // Amer. Rev. Respirat. Disease –1990. –188. N1. – P151-154.
315. Goodfeilow M. – Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. /M. Goodfeilow// -1. Gen. Microbiol. 1985. 69. №1 P.151-154
316. Goodfellow M. Antibiotic sensitivity of some nocardioform bacteria and its value as a criterion for taxonomy. /M. Goodfeilow, V.A. Orchard// Z. gen. Microbiol –1989. –83. –N2. –P375-387.
317. Goodfellow M. Nocardioform bacteria /M. Goodfeilow, D.E. Minnikin// Ann. Rew. Microbiol. –2003. –31. –P.159-180.
318. Goodfellow M. Alshamaony G. Chemical and numerical taxonomy of strains received as *Gordona aurantiaca*. M. Goodfeilow, A.B. Orlean P, M.D.Collins// Z. Gen Microbiolog –1994. –109. –N1. –P. 57-68.
319. Gordon R.E. A study of some acid-fast actinomycetes from soil with special reference to pathogenicity for animals. /R.E. Gordon, W. Hagan// –I. Infect. Dis., 2009. 59. N2, P.200-206.
320. Gordon R.E. Comparotive atudy of some stroins reccived as *Nocardia* /R.E. Gordon// – J. Bacteriol, 1978, 73. №12. P15-27.
321. Harrington B.I., A numerical taxonomical study of some corynebacteria and releted organisms /B.I. Harrington// Z. Gen. Microbiol. –1996. –45. –N1. – P.31-40.
322. Hosry T.S. Health Lab Sci./ T.S. Hosry, C.I. Ms Durmont// –2003. – V.12. –P. 161.
323. Hugh R. The taxonomic significance of fermentative versuse oxidative metabalism of carbohydrates by various grom – positive bacteria /R. Hagh, E. Lifson// Z. bacteriol. –1999. –66. –N1. –P.24-26.
324. Janicki B.W. Amer. Rev Dis /B.W. Janicki, S.D. Chaparas, T.M. Daniel// – 1987. –Vol 104. –N4. –P.602-604.

325. Jensen H.L. Studies on the saprophytic mycobacteria and corynebacteria /H.L. Jensen// Proc. Linn. Soc. N.S.W. –1994. –59. –N1/2. –P. 19-61
326. Joneda T. Studies on the lipids from Nocardia /T. Joneda, C.L. Silva// In: Nocardia and streptomyces. Stuttgart New York: Fescher. – 1987. –P.68-74.
327. Kanetsuna F. 1972 A simple chemical method to differentiate Mycobacterium from Nocardia. /F. Kanetsuna, A. Bartoli// –Z. Gen. Microbiol 1977. 70 N2 –P 209-212.
328. Komura J. Taxonomic significance of phospholipids in coryneform and nocardiform bacteria /J. Komura, K. Yamada, S. Otsuka, K. Komagata// Z. Gen. Appl. Microbiol –1975. –21. –N4. –P251-261.
329. Khuller G.K., Taneja R., Kaur S., Verma I.N. Lipid composition and virulence of Mycobacterium tuberculosis H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> /G.K. Khuller, R. Taneja, S. Kaur, I.N. Verma // Aust I. Exp. Biol. Med. Sci. –1982. –60. –N5. –P. 541-547.
330. Lechevalier M.P., Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. /M.P. Lechevalier// –Int. Z. Syst. Bacteriol 2005. 20. N4. P. 435-443.
331. Lechevalier M.P. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes /M.P. Lechevalier, H.A. Lechevalier// Int. Z. Syst. Bacteriol –2005. –20. –N4. –P 435-443.
332. Lechevalier M.P. Lipid composition in the classification of nocardiae and mycobacteria /M.P. Lechevalier, A.C. Horan, H.A. Lechevalier// Z. Bacteriol. – 1976. –105. –N1. –P 313-318.
333. Lechevalier M.P. Nocardia amarae sp. nov., an actinomycete common in foaming /M.P. Lechevalier, H.A. Lechevalier// –24. –N2. –P. 278-288.
334. Lechevalier M.P. The taxonomy of the genus Nocardia some light at the end of the tunnel? In: The biology of the nocardiae. London ets. /M.P. Lechevalier// Acad. press. – 1987. –P. 1-38.

335. Lechevalier H.A. Introduction to the order Actinomycetales /H.A. Lechevalier, M.P. Lechevalier// The Procariotes. – Berlin. Heidelberg. Springer. – 1989. –vol. 2. –P.1915. – 1922.
336. Lind A. Serological relationships between Nocardia, Mycobacterium and the “Rhodochrous” taxon /A. Lind, M. Ridell// Acad. press. –1976. –P. 220-235.
337. Michei G ,Cell walls of nocardiae /G.Michei, C. Bordet// In: The biology of the nocardiae // Acad. press. –1996. –P-141-159.
338. Misaki A. Structure and immunological properties of D-arabino –D-galactans isolated from cell walls pf Mycobacterium species /A/ Misaki, N. Seto, I. Azuma// Z. Biochem. –1999. –76. -N1. –P. 15-27.
339. Minnikin D. Lipid composition in the classification and identification of acid-fast bacteria /D.Minnikin, M. Goodfellow// -In: Microbiological classification and identification. // Acad. press. 1986. –P. 189-256.
340. Mordarsra H. Differentiation of nocardioform actynomycetes by lysozyme sensitiviti /H. Mordarsra, Cebrats, B. Blach, M. Goodfellow// Z. Gen. Microbiol –1980. –109. –N2. –P. 381-384.
341. Mordarsra H. Chemotaxonimic characters and classification of some nocardioform bacteria. /H. Mordarsra, M. Mordasra, M. Goodfellow// Z. Gen. Microbiol. –2006., -71. –N1. –P77-86.
342. Pine L. Parasitic of farmentative actinomycetes /L. Pine// In: Handbuch of Microbiology. Cleveland: CRC press –1994 –P. 212-220.
343. Prauser H. Considerdtions on the taxonomic relations among gram – positive, branching bacteria. – In: Nocardia and streptomyces Stuttgart; New York: Fiscger /H. Prauser// –1990. –P. 3-12.
344. Raiki K. Zbl. Bacter. I. Abt. Orig./ K. Raiki// –1982. –Bd 251. –S. 389-398.
345. Ratledge C. Lipid soluble, iron – binding compounds in Nocardia and related organisms. /C. Ratletge, P.V. Patel// Acad press. –1995. –P. 372-385.
346. Ratledge C. The Mycobacteria /C. Ratledge// Meadowfield press. –1977. –130 p.

347. Ratledge C. Nutrition, growth and metabolism /C. Ratledge// Acad press. –1992. –Vol 1. –P.185-271.
348. Ridell M. Serological relationships of *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* and the *Rhodococcus* taxon with special reference to taxonomy Goteborg, /M. Ridell// 1995. – 52 p.
349. Ridell M. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis studies on mycobacteria. /M. Ridell, A. Lind// Actinom and rel org. –2007. –14. –N1. –P. 62-67.
350. Ridell M. Immunodiffusion studies of *Mycobacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus* for taxonomic purpose /M. Ridell// In: Astinomycetes. Stuttgart; New York: Fischer. –2000. –P. 235-241.
351. Runyon E.H. Anonymous mycobacteria in pulmonary diseases /E.H. Runyon// Med. Clin. N. Amer. –1989. –43. –N1. –P. 273-290.
352. Silva C.L. Non – hydroxy fatty acids – containing monoacylglycerols from *Nocardia asteroides* Actinom and rel org /C.L. Silva, T. Jneda// -1981. -16. №2. –P.49-52.
353. Songen N Sur la Nutrition Minerale du Bacille Tuberculeux Rep. 86. Inter Congr. Appl. Chem: /N. Songen// 1978. 19 –P. 267-269.
354. Shaw N. Lipid composition as a guide to the classification of bacteria /N. Shaw// Appl Microbiol. -1989. -17 -№1 – P63-108.
355. Shukia R. Observation on nonspecific reactions to tuberculins in sheep and goats with, *Corinebacterium ovis* "Experientia" /R.Shukia// 1991, 27 №2 –C/ 204-205
356. Schleifer K.H. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. /K.H. Schleifer, O. Kandler// Bacterid. Revs. –1972. –36. –N4. –P. 407-477.
357. Schleifer K.H. Chemical structure of the peptidoglycan activity /K.H. Schleifer// Z. Immu. –Forsch. –1975. –149. –N1. –P. 104-117.
358. Schlisser T. Tuberculose bei Homs – und Wildtieren. /T. Schlisser// – Prax. Pneum., 1974, 28, 9, 511-515.

359. Schneidau Z.D. The American review of Respiratory Diseases./Z.D. Schneidau, M.F. Shaffer// –2005. –Vol. 82. –P. 64-76.
360. Stackebrandt E. Taxonomy of the genus *Cellulamonas*, based on phenotypic characters and deoxyribonucleic acid – deoxyribonucleic acid homology, and proposal of seven neotype strains /E. Stackebrandt, O. Kadler// Int. Z. Syst. Bacteriol. –1989. –29. N4. –P.273-282.
361. Stanford I.L., Grange I.M. Tubercle /I.L. Stanford, I.M. Grange// –1999. –Vol. 55. –P. 143-152.
362. Stottmeier K.D. Rapid identification of the taxon *rhodochrous* in the clinical laboratory /K.D. Stottmeier, M.E. Molloy// Appl. Microbiol. –1986. –26. –N2. –P.213-214.
363. Suzuri K.I. Taxonomic significance of the position of double bonds of unsaturated fatty acids in *Corynebacteria* /K.I. Suzuri, F. Kowaguchi, K. Saito// Z. Gen. Appl. Microbiol. –2003. –28. –N5. –P. 409-416.
364. Tomiyasu I. Mycolic acid composition and thermally adaptive changes in *Nocardia asteroides* /I. Tomiyasu// Z. Bacteriol. –1995. –151. –N2. –P. 828-837.
365. Tsuramura M. A taxonomic study of strains received as “*Mycobacterium*” *rhodochrous* /M. Tsuramura// Jap. Z. Microbiol –1973. –17. –N4. –P. 189-197.
366. Tsukamura M. Differentiation of the “*Mycobacterium*” *rhodochrous* group from *nocardiae* by B-galactosidase activity /M. Tsukamura// Z. Gen. Microbiol. –1974. –80. –N2. –P. 553-555.
367. Tsukamura M. Differentiation between the genera *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Nocardia* by susceptibility to 5-fluorouracil /M. Tsukamura// Z. Gen. Microbiol. –1981. –25. –N1. –P. 205-208.
368. Tsukamura M. Lung infection caused by *Gordona aurantiaca* (*R. aurantiacus*) /M. Tsukamura, K. Kawakami// Z. Clin. Microbiol. –1982. –16. –N4. –P. 604-607.
369. Thorel M.F. Tuberculose de la chevre: diagnostic biologique. /M.F. Thorel// Ann. Rech. Vet. –1980. –11. –3. –P. 251-257.

370. Uchida K. Taxonomic significance of cell – wall acyl type in Corynebacterium – Mycobacterium – Nocardia group by a glycolate test. /K. Uchida, K. Aida// Z. Bacteriol –1979. –25. –N3. –P.169-183.

371. Veldkamp H. Saprophytic coryneform bacteria /H. Veldkamp// Ann. Rev. Microbiol. –1970. –24. –P.209-240.

372. Wolinsky E. Mycobacteria in soil and their relation to disease – associated strains /E. Wolinski, T. Ryneerson// Amer. Rev. Respiral. Disease. –2006. –97. –N6. –P.1032-1037.

373. Yano J. Occurrence of acylated trehaloses in Nocardia /J. Yano, V. Furukawa, M. Kusunose// Z. Gen. Appl. Microbiol. –2007. –17. –N4. –P. 329-334.

374. Yomomoto M. Современное состояние вопроса о легочных заболеваниях вызванных атипичными микобактериями в Японии. /M. Yomomoto// Труд 21-й Международ. конференц. по туберкулезу –М., С. 147-148.

375. Zomora A. Z. of Bacteriologi /A. Zomora, L.F. Bojalli, F. Basterrachea// – 1999. –V.85. 3. –P.549-555.

## **Приложения**



РЕСПУБЛИКА ДАГЕСТАН  
МИНИСТЕРСТВО ЭКОНОМИКИ РД  
МИНИСТЕРСТВО ИНВЕСТИЦИЙ И  
ВНЕШНЕЭКОНОМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ РД  
РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ВЫСТАВОЧНО-МАРКЕТИНГОВЫЙ ЦЕНТР  
«Дагестан-ЭКСПО»



17-19 апреля 2011

# ДИПЛОМ НАГРАЖДАЕТСЯ

**Комплексный аллерген для дифференциации  
аллергических реакций на ППД-туберкулин  
для млекопитающих**

*Автор: Баратов М.О., Ахмедов М.М.  
(ДГСХА им. Джамбулатова)*

Заместитель Председателя  
Правительства РД  
Председатель  
Оргкомитета

Р. К. Газимагомедов

Махачкала  
апрель 2011 г.

РЕСПУБЛИКА ДАГЕСТАН  
МИНИСТЕРСТВО ЭКОНОМИКИ РД  
МИНИСТЕРСТВО ИНВЕСТИЦИЙ И  
ВНЕШНЕЭКОНОМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ РД  
РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ВЫСТАВОЧНО-МАРКЕТИНГОВЫЙ ЦЕНТР  
«Дагестан-ЭКСПО»



17-19 апреля 2011

# ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

**Коринобактерии**

*Автор: Ахмедов М.М., Баратов М.О.,  
Джамбулатов З.М.  
(ДГСХА им. Джамбулатова)*

Заместитель Председателя  
Правительства РД  
Председатель  
Оргкомитета

Р. К. Газимагомедов

Махачкала  
апрель 2011 г.

# РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2588670

### ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КОРИНЕБАКТЕРИЙ

Патентообладатель(ли): *Государственное научное учреждение  
Прикаспийский зональный научно-исследовательский  
ветеринарный институт Российской академии  
сельскохозяйственных наук (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

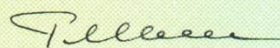
Заявка № 2014120590

Приоритет изобретения 21 мая 2014 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре  
изобретений Российской Федерации 07 июня 2016 г.

Срок действия патента истекает 21 мая 2034 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ивлиев



# РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2592372

### СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ КОРИНЕБАКТЕРИОЗА И АССОЦИАТИВНЫХ С КОРИНЕБАКТЕРИЯМИ ИНФЕКЦИЙ У ЖИВОТНЫХ

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение "Прикаспийский зональный научно-  
исследовательский ветеринарный институт" (RU)*

Автор(ы): *с.м. на обороте*

Заявка № 2015106091

Приоритет изобретения 20 февраля 2015 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре  
изобретений Российской Федерации 29 июня 2016 г.

Срок действия патента истекает 20 февраля 2035 г.

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

*Г.П. Ивлиев*



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2409387

**КОМПЛЕКСНЫЙ АЛЛЕРГЕН ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ  
АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ НА ППД-ТУБЕРКУЛИН  
ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Патентообладатель(ли): *Государственное научное учреждение  
"Прикаспийский зональный научно-исследовательский  
ветеринарный институт" (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

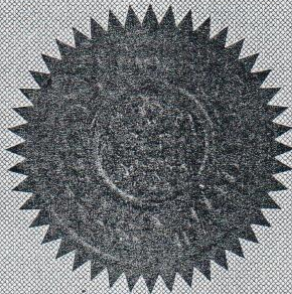
Заявка № 2009104660

Приоритет изобретения **11 февраля 2009 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре  
изобретений Российской Федерации **20 января 2011 г.**

Срок действия патента истекает **11 февраля 2029 г.**

*Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной  
собственности, патентам и товарным знакам*



*Б.П. Симонов*

Автор(ы): *Баратов Магомед Омарович (RU), Ахмедов Магомед Муртузалиевич (RU), Кабардиев Садрутдин Шамишович (RU), Алиев Али Давудович (RU)*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 409 387** <sup>(13)</sup> **C2**

(51) МПК  
*A61K 39/35* (2006.01)  
*C07K 4/04* (2006.01)  
*C12R 1/32* (2006.01)

**(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2009104660/10, 11.02.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
11.02.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.02.2009

(43) Дата публикации заявки: 20.08.2010 Бюл. № 23

(45) Опубликовано: 20.01.2011 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2217165 C1, 10.09.2003. RU 2164804 C2,  
10.04.2001. RU 2045959 C1, 20.10.1995.

Адрес для переписки:

367009, РД, г.Махачкала, ул. Чайковского, 8,  
кв.3, М.О.Баратову

(72) Автор(ы):

Баратов Магомед Омарович (RU),  
Ахмедов Магомед Муртузалиевич (RU),  
Кабардиев Садрутдин Шамшитович (RU),  
Алиев Али Давудович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное научное учреждение  
"Прикаспийский зональный научно-  
исследовательский ветеринарный институт"  
(RU)

**(54) КОМПЛЕКСНЫЙ АЛЛЕРГЕН ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ  
НА ППД-ТУБЕРКУЛИН ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

**(57) Формула изобретения**

Комплексный аллерген для дифференциации аллергических реакций у крупного рогатого скота на ППД-туберкулин для млекопитающих, полученный осаждением белка из культуры штамма *M.scrofulaceum* №12-С и *M.intracellulare* №13-Н, отличающийся тем, что дополнительно содержит аллерген из коринебактерий, полученный из культуры *Corynebacterium xerosis* штамм №1911, в количестве 1350 единиц действия.

RU 2 409 387 C2

RU 2 409 387 C2

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 409 387**<sup>(13)</sup> **C2**



(51) МПК  
A61K 39/35 (2006.01)  
C07K 4/04 (2006.01)  
C12R 1/32 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009104660/10, 11.02.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
11.02.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.02.2009

(43) Дата публикации заявки: 20.08.2010 Бюл. № 23

(45) Опубликовано: 20.01.2011 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2217165 C1, 10.09.2003. RU 2164804 C2,  
10.04.2001. RU 2045959 C1, 20.10.1995.

Адрес для переписки:

367009, РД, г.Махачкала, ул. Чайковского, 8,  
кв.3, М.О.Баратову

(72) Автор(ы):

Баратов Магомед Омарович (RU),  
Ахмедов Магомед Мургузалиевич (RU),  
Кабардиев Садрутдин Шамшитович (RU),  
Алиев Али Давудович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное научное учреждение  
"Прикаспийский зональный научно-  
исследовательский ветеринарный институт"  
(RU)

(54) КОМПЛЕКСНЫЙ АЛЛЕРГЕН ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ  
НА ППД-ТУБЕРКУЛИН ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к ветеринарной  
медицине. В настоящее время для  
дифференциации неспецифических реакций на  
туберкулин у крупного рогатого скота  
используют ППД-туберкулин для  
млекопитающих и КАМ и по интенсивности  
реакций определяют характер сенсibilизации.  
Известный комплексный аллерген получают  
осаждением белка из культур штаммов *M. scrofulaceum* №12-С и *M. intracellulare* №13-Н, в  
который дополнительно включают аллерген,

полученный из *Corynebacterium xerosis* N1911, в  
количестве 1350 единиц действия. Наличие  
аллергена из коринебактерий в составе КАМ  
повышает эффективность симультанной пробы  
с ППД-туберкулином для млекопитающих при  
дифференциации неспецифических реакций,  
вызванных коринебактериями. Использование  
заявляемого аллергена позволяет  
предотвратить неоправданный убой животных,  
а также расходы на проведения дальнейших  
исследованиях для уточнения диагноза. 2 табл.

RU 2 409 387 C 2

RU 2 409 387 C 2



Изобретение относится к области ветеринарной медицины и рекомендовано использовать для дифференциации аллергических реакций на ППД-туберкулин для

5 млекопитающих.  
В практике аллергических исследований на туберкулез известны многочисленные случаи, когда у реагирующих на ППД - туберкулин крупного рогатого скота, патологоанатомическими и бактериологическими методами исследования обнаружить туберкулез не удается и причина сенсибилизации остается невыясненной.

10 Установлено, что основной причиной проявления реакций на туберкулин у здоровых животных является сенсибилизация атипичными микобактериями, имеющими общие антигены с возбудителем туберкулеза [1, 2, 3].

Кроме того, причиной сенсибилизации макроорганизма к туберкулину могут быть нокардий и родококки, имеющие общие родоспецифические данные с микобактериями [5, 6].

15 Огромный интерес в этой связи представляют коринебактерии, имеющие с микобактериями общие физико-химические и биологические свойства и широко распространенные в природе [4, 10]. Имеются сообщения [6, 11] о том, что зараженные коринебактериями животные реагируют на ППД-туберкулин для млекопитающих.

20 Многообразие причин, способствующих сенсибилизации животных к туберкулину затрудняет дифференциальную диагностику туберкулеза, что в конечном итоге оборачивается значительным экономическим ущербом для хозяйств.

Указанное явление вызывает необходимость определения специфичности аллергии, результаты которых могут привести к повышению эффективности аллергического метода при диагностике туберкулеза животных.

25 Для аллергической диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота используют ППД - туберкулин для млекопитающих, для получения которой *M.bovis*, штамм №8, выращивают на среде Сотона, в течение 2-х месяцев [8]. Дифференциацию сенсибилизации вызванной птичьим видом микобактерии проводят в симультанной пробе, с использованием очищенного туберкулина для птиц и ППД-туберкулина для млекопитающих. Туберкулин для птиц готовят из *M.avium* (штамм №2282), и по разнице интенсивности реакций определяют причину сенсибилизации.

30 Известны аллергены, полученные из нокардий и родококков [5], которые в составе комплексного аллергена повышают эффективность симультанной пробы с ППД-туберкулином при дифференциации неспецифических реакций. Кроме того, аллерген из *N.asteroides* используется для аллергической диагностики нокардиоза.

40 По технической сущности близким к заявляемому аллергену является комплексный аллерген из атипичных микобактерий (КАМ), состоящий из *M.scrofulaceum* №12-С и *M.intracellulare* №13-Н [8]. Для получения аллергена культуру выращивают на синтетической среде Сотона, осаждают белок трихлоруксусной кислотой и переосаждают серноокислым аммонием. В дальнейшем для удаления солей проводят диализ через целлофановую оболочку против обессоленной воды.

45 Содержание единиц (ЕД.) в растворе белка каждого вида определяют на зараженных гаммологичными микобактериями морских свинок в сравнении с препаратами известной активности. Полученные таким образом моноаллергены смешивают в равных количествах по содержанию единиц. Несмотря на выраженные дифференцирующие свойства в сравнении с туберкулином для птиц, комплексный 50 аллерген из атипичных микобактерий имеет и существенный недостаток: эффективность зависит от степени родства микобактерий, вызвавших сенсибилизацию и микобактерий, использованных для изготовления аллергена[9].

Целью настоящего изобретения является повышение эффективности дифференциации аллергических реакций в симультанной пробе с КАМ за счет расширения его антигенной структуры.

5 Указанная цель достигается тем, что в состав комплексного аллергена из атипичных микобактерий, содержащего антигены из *M.scrofulaceum* №12-С и *M.intracellulare* №13-Н, вносится антиген из коринебактерий (*Corynebacterium xerosis* N1911).

10 Сопоставительный анализ состава аллергенов позволяет сделать вывод, что заявляемый аллерген существенно отличается от известного содержанием большего количества аллергенов за счет введения коринебактериозного аллергена. Таким образом, заявляемый аллерген существенно отличается от прототипа и поэтому соответствует критерию «новизна».

15 Для изготовления аллергена культуру коринебактерий (*Corynebacterium xerosis* N1911) выращивали на синтетической среде Сотона с добавлением смеси индивидуальных n-алканов, содержанием в цепи от 10 до 17 атомов углерода, в течение 2-х месяцев. Следует отметить, что среда Сотона нами была модифицирована и сравнительно испытана ранее. Результаты этих испытаний показали большую 20 эффективность модифицированного варианта для выращивания коринебактерий, биомасса которых превышала контрольные серии более 2-х раз. Это позволило получить в 2 раза больше активного белка к единице объема. Колбы с культурой, где толщина слоя бакмассы достигала около 1 см, автоклавировали при 1,5 атм в течение 30 мин. Отделяли бактериальную массу фильтрацией и центрифугированием, 25 после чего проводили осаждение белка. Из объема супернатанта в количестве 1,5 литров осаждением в изoeлектрической точке NaCl (18% концентрации, при РН 4,1) получили 3,2 гр белка. Осадок промыли, высушили, расфасовали в стеклянные флаконы и хранили в холодильнике.

30 Испыгуемые концентрации белка (0,00005; 0,0001; 0,0002; 0,0003; 0,0004 и 0,0005 мг в 0,1 мл) получили, разбавив 0,01 мл (0,001 г) раствора 10% концентрации в стерильном физиологическом растворе (1: 1000). После перемешивания по 0,1 мл раствора внесли поочередно в пробирки с физиологическим раствором (9,9; 4,9; 2,9; 2,4; 1,9 и 19,9 мл), получив, таким образом, разведение, 1:100, 1:50, 1:30, 1:25, 1:20, и 1: 35 200 соответственно.

40 Определение пороговой чувствительности аллергена проводили на 24 морских свинках, 4 - находились на контроле, через 25 дней после подкожного заражения коринебактериями, в дозе 10 мг влажной культуры в 1 мл физиологического раствора. Каждую титруемую дозу аллергена, в 0,1 мл раствора вводили внутрикожно, на депилированный участок боковой реберной поверхности. Реакцию оценивали через 32 45 часа после введения. При этом определяли интенсивность реакций (в мм<sup>2</sup>) по диаметру папулы, вычисляли площадь, усредненную величину интенсивности реакций, на определенную концентрацию белка. Полученные результаты представлены в таблице 1.

50 Морские свинки контрольной группы на аллергены не реагировали. На концентрацию белка 0,00005 мг реакция была у одной морской свинки интенсивностью 1,8 мм<sup>2</sup>. Во второй группе на концентрацию 0,0001 мг реагировали 2 морские свинки со средней интенсивностью 4,6 мм.

В остальном, на концентрацию белка 0,0002; 0,0003; 0,0004 и 0,0005 мг реагировали все подопытные животные, причем не установили прямой зависимости реакций от дальнейшего увеличения белка в аллергене.

Таким образом, пороговая чувствительность аллергена находится в пределах 0,00005 мг в 0,1 мл раствора, которая повышается до концентраций 0,0003 мг и в дальнейшем независимо от увеличения, интенсивность реакций снижается. Поэтому за единицу белка коринебактерий была принята доза - 0,0003 мг в 0,1 мл раствора.

5 Заявляемый аллерген готовили исходя из содержания белка в КАМ-е - 1350 единиц действия в 0,2 мл раствора и 0,0003 мг белка коринебактерий в 0,1 мл, которая была нами принята за единицу. Для этого взяли 20,25 мг влажной культуры *Corynebacterium xerosis* и смешали с 10 мл КАМ-а. Таким образом, получили 10 мл аллергена, состоящего из белков атипичных микобактерий и коринебактерий. Для получения рабочего раствора, содержанием 15 единиц действия в 0,1 мл, на морскую свинку, 0,2 мл (1350 ед), растворили в 8,8 мл физраствора (1:45).

10 Испытание полученного аллергена проводили на зараженных мииобактериями (*Scrofulaceum* и БЦЖ) и коринебактериями (*xerosis*) морских свинок через 27 дней после заражения. Каждой культурой были заражены по 3 морские свинки и 3 находились на контроле.

15 Исследование проводили в политесте. Опытным морским свинкам на депилированный участок реберной поверхности вводили испытуемый аллерген с одной стороны и КАМ с другой в дозе 0,1 мл (10 ед). Оценку реакций проводили через 24 часа после введения. Результаты приведены в таблице 2.

20 Наибольшая интенсивность реакций на изучаемый аллерген была обнаружена у морских свинок, зараженных коринебактериями (117,17 мм<sup>2</sup>). Реакция на КАМ в этой группе была заметно меньше.

25 В остальных группах морские свинки на изучаемый аллерген реагировали менее интенсивно, хотя на КАМ реакция была выражено больше.

30 Таким образом, у зараженных коринебактериями морских свинок, по чувствительности комплексный аллерген с содержанием коринебактериозного аллергена превосходит КАМ в 2 раза.

35 Производственное испытание аллергена провели в хозяйстве, где среды коров и нетелей разного возраста постоянно выявляются реагирующие на туберкулин животные, однако результаты симультанной пробы с КАМ остаются неопределенными.

40 В симультанной пробе с испытуемым аллергеном исследовали 14 положительно реагирующих на туберкулин животных из 64 происследованных. При учете результатов количество положительно реагирующих (реакция интенсивнее на ППД-туберкулин) составило 1 животное, отрицательно реагирующих (реакция на испытуемый аллерген интенсивнее) - 12 голов. Количество реагирующих в равной степени составило 1 животное. Отсюда следует, что различие в интенсивности реакций на туберкулин и на испытуемый аллерген достоверно и результаты симультанной пробы считаются определенными. Поэтому с уверенностью можно констатировать, что животные данного хозяйства, у которых длительное время результаты симультанной пробы с КАМ оставались неопределенными, сенсibilизированы неспецифически.

50 Полученные результаты позволяют сделать вывод: чувствительность предлагаемого аллергена превосходит чувствительность прототипа (КАМ) как при выявлении зараженных коринебактериями животных, так и сенсibilизированных атипичными мииобактериями, повышая при этом эффективность симультанной пробы при дифференциации неспецифических реакций на ППД-туберкулин.

Таким образом, использование заявляемого аллергена в симультанной пробе с

КАМ, позволяет предотвратить неоправданный убой животных, а также снизить расходы на проведение организационно-хозяйственных и ветеринарно-санитарных мероприятий.

Источники информации

1. Кассич Ю.Я. Изучение сенсibiliзирующих и патогенных свойств атипичных микобактерий // Ветеринария - 1989. - №4. - С.13-15.
2. Марша О.Б., Тяхнас К.К. Парааллергические реакции на туберкулин и их дифференциация // Ветеринария. - 1978. - №4. С.35-38.
3. Марша О.В., Овдиенко Н.П., Ткачев-Кузмин А.В. // Туберкулез сельскохозяйственных животных. - М.: Агропромиздат, 1991. - С.28-32.
4. Нестеренко О.А. Нокардоподобные и коринеподобные бактерии. // Киев: Науково думка. 1985. 333 стр.
5. Нуратинов Р.А. Способ дифференциации диагностики туберкулеза. Патент на изобретение №2146946. - 1998 г.
6. Нуратинов Р.А. Туберкулез крупного рогатого скота в республиках Северного Кавказа и Калмыкии (эпизоотология, диагностика и меры борьбы) Дисс. док. вет. наук. Москва - 1998. - 370 стр.
7. Нуратинов Р.А., Баратов М.О., Вердиева Э.А. Комплексный аллерген для дифференциации аллергических реакций у крупного рогатого скота на ППД-туберкулин для млекопитающих. Патент на изобретение №2217165. - 2003 г.
8. Шаров А.Н. и др. Препараты для диагностики туберкулеза у животных. // Курская биофабрика 100 лет. - 1996. - С.374-403.
9. Шаров А.Н. Аллергическая диагностика туберкулеза у животных: Повышение ее эффективности. Дисс. док. вет. наук. Москва - 1989 г.
10. Ridll M-Serological relationships of Nocordia, Mycobacterium, Corynebacterium and the Rhodochrous taxon with special reference to taxonomy Goteborg. /1977. - 52p.
11. Shukia R., Nafh N., Singh G. Observations on non-specific reactions to tuberculin in sheep and goats with Coiynebacterium ovis «Experientia» 1971.27. №2. - 204-205.

Зависимость интенсивности реакций на аллергены от концентраций белка в растворе			Таблица 1
Концентрация белка в аллергене (мг в 0,1 мл)	(Corynebacterium xerosis N1911),		
	Интенсивность реакций, мм <sup>2</sup>	M±m	
0,0005	-	0,45±0,03	
	1,8		
	-		
0,0001	6,3	4,6±0,8	
	-		
	12,4		
	-		
0,0002	21,6	28,4±8,6	
	30,4		
	28,2		
	33,4		
0,0003	90,3	83,2±18,9	
	72,4		
	87,2		
	83,1		
0,0004	86,3	70,7±15,3	
	60,5		

		64,8	
		71,2	
	0,0005	70,7	60,4±13,2
		50,3	
		64,2	
		58,4	

Таблица 2

Интенсивность реакций у зараженных морских свинок на изучаемый аллерген

№	Вид заражаемой культуры	Кол-во животных в опыте	Интенсивность реакций в мм <sup>2</sup> на			
			Комплексный аллерген	M±m	КАМ	M±m
1	Corynebacterium xerosis	1	126,12±18,9	117,17	67,34±7,6	65,05
		2	119,18±16,4		75,62±8,3	
		3	106,22±12,8		52,19±6,7	
2	Mycobacterium scrofulaceum	1	97,65±11,2	95,55	99,70±11,9	95,64
		2	100,16±12,1		96,54±10,3	
		3	91,84±9,7		90,69±9,6	
3	Mycobacterium БЦЖ	1	108,76±13,1	70,68	100,64±12,6	94,90
		2	93,53±10,2		91,36±9,8	
		3	90,75±9,6		92,44±9,92	
4	Контроль	1	-	-	-	-
		2	-		-	
		3	-		-	

Формула изобретения

Комплексный аллерген для дифференциации аллергических реакций у крупного рогатого скота на ППД-туберкулин для млекопитающих, полученный осаждением белка из культуры штамма *M. scrofulaceum* №12-С и *M. intracellulare* №13-Н, отличающийся тем, что дополнительно содержит аллерген из коринебактерий, полученный из культуры *Corynebacterium xerosis* штамм №1911, в количестве 1350 единиц действия.

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

ГНУ «Прикаспийский зональный научно-исследовательский  
ветеринарный институт»

ФГОУ ВПО «Дагестанская государственная сельскохозяйственная  
академия»

# Коринебактерии

Общая характеристика, идентификация,  
методы выделения и генетические свойства

( Методические рекомендации)

Махачкала 2010

Методические рекомендации подготовили: кандидат ветеринарных наук, доцент М.О. Баратов, доктор ветеринарных наук, профессор М.М. Ахмедов, доктор ветеринарных наук, профессор С.Ш.Кабардиев и кандидат ветеринарных наук О.П.Сакидиров.

Рассмотрены и одобрены ученым советом ГНУ «Прикаспийского ЗНИВИ» (от 9.02.10 протокол № 4), НТС МСХ РД (от 24.12.09 протокол № 3), и методическим советом Даггоссельхозакадемии (от 24.03.10г. протокол № 7).

Предназначены для научно-исследовательских и учебных ветеринарных учреждений, для работников ветеринарных лабораторий, также, могут быть полезны для практических ветеринарных врачей.

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**  
**ФГОУ ВПО**  
**«ДАГЕСТАНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ**  
**АКАДЕМИЯ»**  
**ГНУ ПРИКАСПИЙСКИЙ ЗОНАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ**  
**ВЕТЕРИНАРНЫЙ ИНСТИТУТ**

**МЕРОПРИЯТИЯ ПО ОЗДОРОВЛЕНИЮ**  
**ХОЗЯЙСТВ ОТ ТУБЕРКУЛЁЗА**

(Методические рекомендации)

**ОБЩЕЕ ПОЛОЖЕНИЕ**

Туберкулез — хронический протозойный инфекционный процесс, вызываемый микобактериями, характеризующийся образованием в ранах животных, особенно в легких туберкулезных безгоссулусных узелков (туберкулов) последующим их развитием в каверны.

Инфекция туберкулеза — классическим заболеванием скотоболезней и циркулирует среди животных и человека. У животных туберкулез вызывают микобактерии трех видов: *M. bovis* (видов *M. tuberculosis* (человеческой), и *M. avium* (стрептофильная) группы). Туберкулез туберкулеза у животных и человека.

Махачкала 2009



Методические рекомендации подготовили: кандидат ветеринарных наук, доцент М.О.Баратов, доктор ветеринарных наук, профессор М.М. Ахмедов, доктор ветеринарных наук, профессор З.М. Джамбулатов и кандидат ветеринарных наук О.П. Сакидибиров.

Рассмотрены и одобрены методическим советом Даггоссельхозакадемии (от 23.12.09 протокол №4), Ученым советом Прикаспийского ЗНИВИ (от 10.12.09 протокол № 1), и НТС РД (от 24.12.09 протокол № 3).

Предназначены для учебных, научно-исследовательских ветеринарных учреждений и практических ветеринарных работников.

© М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, З.М. Джамбулатов, О.П. Сакидибиров, 2009

© Даггоссельхозакадемия, 2009

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
ФГОУ ВПО

«Дагестанская государственная сельскохозяйственная академия»

ГНУ Прикаспийский зональный научно-исследовательский ветеринарный  
институт

**Диагностика, профилактика и меры борьбы с  
туберкулёзом крупного рогатого скота в Дагестане**

(методические рекомендации)

Махачкала 2009

Методические рекомендации подготовили: кандидат ветеринарных наук, доцент М.О. Баратов, доктор ветеринарных наук, профессор М.М. Ахмедов и доктор ветеринарных наук, профессор З.М. Джамбулатов.

Рассмотрены и одобрены методическим советом Даггоссельхозакадемии (от 25.03.09 протокол № 7), Ученым советом Прикаспийского ЗНИВИ (от 4.02.09 протокол № 2), и НТС МСХ РД (от 28.03.09 протокол № 2).

Предназначены для учебных и научно-исследовательских ветеринарных учреждений и практических ветеринарных работников.

© М.О. Баратов, М.М. Ахмедов, З.М. Джамбулатов, 2009  
© Даггоссельхозакадемия, 2009

ГНУ « Прикаспийский зональный научно-исследовательский  
ветеринарный институт»

ФГОУ ВПО « Дагестанская государственная  
сельскохозяйственная академия»

М.О.Баратов, З. М.Джамбулатов, М.М.Ахмедов,  
О.П.Сакидибиров, Н.А.Алиев.

# Коринебактерии

Махачкала 2011 г.

УДК 619. 616. 982. 211: 636. 2  
Б – 262

**Авторы:**

кандидат ветеринарных наук, доцент Баратов М.О.  
доктор ветеринарных наук, профессор Джамбулатов З.М.  
доктор ветеринарных наук, профессор Ахмедов М.М.  
кандидат ветеринарных наук Сакидибиров О.П.  
ветеринарный врач Алиев Н.А.

**Рецензенты:**

Заведующий кафедрой эпизоотологии и микробиологии Ставропольского ГАУ, Заслуженный деятель науки РФ, доктор биологических наук, профессор **Дмитриев Анатолий Федорович**.

Проректор по инновационным технологиям Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, член-корреспондент Россельхозакадемии, заслуженный ветеринарный врач РФ, доктор биологических наук, профессор **Девришов Давуд Абдулсемедович**

**Баратов М.О и др.**

Коринебактерии / М.О. Баратов, З.М. Джамбулатов, М.М. Ахмедов, О.П. Сакидибиров, Н.А. Алиев. 2011 г. - 95 с.; 7 ил.

ISBN 978-5-904017-71-2

В книге обобщены современные данные о коринебактериях. Приведены лабораторные методы выделения, показаны дифференцирующие признаки от близкородственных микроорганизмов. Обобщены работы по культивированию и испытанию коринебактерий в лабораторных и в производственных условиях. Даны болезни, протекающие с участием коринебактерий, а также заболевания вызываемые коринеформными бактериями.

Книга предназначена для научных работников, специалистов и студентов ветеринарного профиля, а также сотрудников вузов биологического направления.

© М.О. Баратов, З.М. Джамбулатов, М.М. Ахмедов,  
О.П. Сакидибиров, Н.А. Алиев, 2011 г.



Утверждаю  
Руководитель РБУ РД  
«Республиканское ветеринарное  
управление»  
Газимагомедов М.Г.

### Акт

От 2 по 5 апреля 2012 года, СПК «Рассвет» Лакского района, Бабаюртовская зона отгонного животноводства.

Мы, ниже подписавшиеся в составе, главного государственного ветеринарного инспектора Лакского района Абачараева М.А., ветеринарного врача Магомедова А.Х, заведующего лабораторией туберкулеза ПЗНИВИ к.в.н. Баратова М.О., научных сотрудников лаборатории ЭДП туберкулеза Нажалова М.И, и Вердиевой Э.А., составили настоящий акт о том, что произвели испытание симультанной пробы с ППД - туберкулином для млекопитающих и коринебактериозным сенситином в составе КАМ, на 88 животных (коровы и нетели) оставшихся в группе с неопределенными реакциями в симультанной пробе с КАМ.

При этом использован туберкулин Курской биофабрики, серия 6, контроль 6, изготовлен 25.02.2011 года. Срок годности -5лет. Комплексный аллерген готовили исходя из содержания белка в КАМ-е - 1350 единиц действия в 0,2 мл, и 0,0003мг белка коринебактерий. Для чего, 20,25 мг влажной культуры *S. xerosis* смешивали с 10 мл КАМ-а.

Туберкулин и КАМ вводили внутрикожно на бесшёрстный участок средней трети шеи, строго симметрично, безыгольным инъектором Би-7. Учет и оценку реакции проводили через 72 часа.

При определении достоверности различия в интенсивности реакции на аллергены, выявлено: 56 животных с отличающимися реакциями («+»или «-»), на ППД - туберкулин для млекопитающих - 6 голов (положительно), 50 голов на КАМ (отрицательно). Следовательно, реакции на КАМ с достоверностью не менее 95% более интенсивны, чем на туберкулин, что свидетельствует о заражении животных микобактериоподобными микроорганизмами, в частности коринебактериями.

Абачараев М.А.

Магомедов А.Х.

Баратов М.О

Нажалов М.И

Вердиева Э.А.

5.04. 2012 года



Утверждаю  
Руководитель РБУ РД  
«Республиканское ветеринарное  
управление»  
Газимагомедов М.Г.

## Акт

От 5 по 7 октября 2013 года, ГУП «Каспий» Каякентского района

Мы, ниже подписавшиеся в составе, ветеринарного инспектора Каякентского района Даудова Р.В., главного специалиста эксперта комитета ветеринарии МСХ по РД Давыдова М.А, заведующего лабораторией туберкулеза ПЗНИВИ к.в.н. Баратова М.О., научных сотрудников лаборатории ЭДП туберкулеза Вердиевой Э.А, и Нажалова М.И., составили настоящий акт о том, что произвели испытание в симультанной пробе ППД - туберкулина для млекопитающих и моноаллергенов из нокардии и родококков на 326 реагирующих на туберкулин животных, у которых результаты симультанной пробы с КАМ оставались неопределенными.

При этом использован туберкулин Курской биофабрики, серия 8, контроль 8, изготовлен 16.09.2012 года. Срок годности -5лет.

Туберкулин и сенситины из нокардии и родококков вводили внутрикожно на бесшёрстный участок средней трети шеи безыгольным инъектором Би-7. Учет и оценку реакции проводили через 72 часа.

При определении достоверности различия в интенсивности реакции на аллергены, выявлено: 164 животных с отличающимися реакциями («+»или «-»), в 1-й группе из 91 животных на туберкулин реагировало 12(положительно), на нокардиозный аллерген -79 (отрицательно). В 2-й группе из 73 животных, реагировало на туберкулин -19(положительно), на родококковый сенситин -54(отрицательно). Следовательно, реакции на сенситины из нокардии и родококков достоверностью не менее 95% более интенсивны, чем на туберкулин, что свидетельствует о заражении животных микобактериоподобными микроорганизмами, в частности нокардиями и родококками.

Даудов Р.В.

Давыдов М.А.

Баратов М.О.

Вердиева Э.А.

Нажалов М.И.

7.10 2013



Утверждаю  
Руководитель РБУ РД  
«Республиканское ветеринарное  
управление»  
Газимагомедов М.Г.

### Акт

От 3 по 5 мая 2014 года, СПК «Даниял» Хасавюртовского района

Мы, ниже подписавшиеся в составе, ветеринарного инспектора Хасавюртовского района Абдурашидова Т.И., главного специалиста эксперта комитета ветеринарии МСХ по РД Давыдова М.А., заведующего лабораторией туберкулеза ПЗНИВИ к.в.н. Баратова М.О., научных сотрудников лаборатории ЭДП туберкулеза Вердиевой Э.А., Нажалова Э.А., составили настоящий акт о том, что произвели испытание симультанной пробы с ППД - туберкулином для млекопитающих и комплексным аллергеном из микобактериоподобных микроорганизмов, на 136 реагирующих на туберкулин животных у которых результаты симультанной пробы с КАМ оставались неопределенными.

При этом использован туберкулин Курской биофабрики, серия 10, контроль 10, изготовлен 3.03.2013 года. Срок годности -5лет, и КАМ (M.scrofulaceum №12-С , M. intracellulare №13-Н), расширенный антигенами из коринебактерий (Corinebacterium xerosis N1911), нокардий (N.asteroides ВКМ Ас 1077) и родококков (R. bronchialis ИМВ Ас 737).

Туберкулин и КАМ вводили внутрикожно на бесшёрстный участок средней трети шеи, строго симметрично, безыгольным инъектором Би-7. Учет и оценку реакции проводили через 72 часа.

При определении достоверности различия в интенсивности реакции на аллергены, выявлено: 97 животных с отличающимися реакциями («+»или «-»), на ППД - туберкулин для млекопитающих - 16 голов (положительно), 81 голова на расширенный КАМ (отрицательно). Следовательно, реакции на КАМ с достоверностью не менее 95% более интенсивны, чем на туберкулин, что свидетельствует о заражении животных микобактериоподобными микроорганизмами.

Абдурашидов Т.И.

Давыдов М.А.

Баратов М.О

Вердиева Э.А

Нажалов М.И

5.03.2014 года



## Акт

Мы, ниже подписавшиеся в составе директора ГБУ РД «Ботлихская зональная ветеринарная лаборатория», к.в.н. Сакидибирова О.П., ветеринарного врача серолога Рамазановой Х.Н., ветеринарного врача бактериолога Якубовой П.Т., лаборанта Дибировой Х.Д., заведующего кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО ДагГАУ им М.М. Джамбулатова Ахмедова М.М., заведующего лабораторией туберкулеза ПЗНИВИ к.в.н., Баратова М.О., научных сотрудников Нажалова М.И., Вердиевой Э.А., произвели испытание усовершенствованной питательной среды для выделения коринебактерий.

Среду готовили следующим образом: к 60 гр. сухой хинозольной среды Бучина добавили 1 литр геотермальной воды, размешали, довели до кипения, кипятили в течение 2 минут до полного растворения агара и образования крупнопузырчатой быстро оседающей пены. После охлаждения до 50°C добавили 5% стерильной дефибрированной крови крупного рогатого скота. Тщательно размешивая, не допуская образование пены, разлили в чашки Петри. После застывания среду слегка подсушили в термостате при температуре (37±1)°C в течение 40-60 минут. Цвет готовой среды темно-синий. Хранили в холодильнике, использовали в течение 3-4 суток. Оценку сред проводили посевом тест-штаммов и свежевыделенных культур коринебактерий.

В качестве музейного штамма использовали *Corynebacterium xerosis* N1911, а нативным материалом служили лабораторные штаммы, выделенные из почвы. Культуру каждого штамма высевали в 6 чашках Петри каждой среды. Для соблюдения равнозначности опыта материал высевали равными дозами (500 клеток в 0,1 мл.). Результаты учитывали через 24 и 48 часов. Опыты повторялись двукратно.

При учете результатов, Предлагаемая среда показала высокие дифференцирующие и ингибирующие свойства. Колонии появились на 1 сутки в количестве от 19 до 32 в чашках с тест штаммами и до 18 колонии с нативным материалом. На 2 сутки картина практически не изменилась, что является показателем высокой ингибирующей активности. Рост отличался не только числом, но и характером и размером колонии.

Сакидибиров О.П.

Рамазанова Х.Г.

Якубова П.Т.

Дибирова Х.Д.

Ахмедов М.М.

Баратов М.О.

Вердиева Э.А.

Нажалов М.И.

7.11 2015 год

## Акт

Мы, ниже подписавшиеся в составе директора ГБУ РД «Республиканская ветеринарная лаборатория» д.в.н. Карсакова Н.Т., заведующего бактериологическим отделом Магомедова М.З., заведующего кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО ДагГАУ им М.М.Джамбулатова Ахмедова М.М., заведующего лабораторией туберкулеза ПЗНИВИ к.в.н., Баратова М.О., научных сотрудников Нажалова М.И., Вердиева Э.А., произвели испытание усовершенствованной питательной среды для выделения коринебактерий.

Среду готовили следующим образом: к 60 гр. сухой хинозольной среды Бучина добавили 1 литр геотермальной воды, размешали, довели до кипения, кипятили в течение 2 минут до полного растворения агара и образования крупнопузырчатой быстро оседающей пены. После охлаждения до 50°C добавили 5% стерильной дефибринированной крови крупного рогатого скота. Тщательно размешивая, не допуская образование пены, разлили в чашки Петри. После застывания среду слегка подсушили в термостате при температуре (37±1)<sup>0</sup>С в течение 40-60 минут. Цвет готовой среды темно-синий. Хранили в холодильнике, использовали в течение 3-4 суток. Оценка сред проводилась посевом тест-штаммов и свежевыделенных культур коринебактерий.

В качестве музейного штамма использовали *Corynebacterium xerosis* N1911, *Corynebacterium ulcerans* N675, а нативным материалом служили лабораторные штаммы, выделенные из объектов внешней среды (почва, корма, навоз и кровь крупного рогатого скота). Культуру каждого штамма высевали в 5 чашках Петри каждой среды. Для соблюдения равнозначности опыта материал высевали равными дозами (500 клеток в 0,1 мл.).

При учёте результатов провели сравнительный анализ эффективности сред: Нитритного агара, Сотона, Клауберг, Кровяного агара, Кровяно-теллуритового агара, Сывороточного агара и классической формы среды Бучина, с предлагаемым, по скорости роста, по величине колоний и ингибирующим к сопутствующей микрофлоре свойствам. Результаты учитывали через 24 и 48 часов. Опыты повторялись двукратно.

На месте роста культуры среда окрашивалась в фиолетовый цвет, а колонии в синий.

Рост колоний на среде Бучина формировался на первые сутки от 2 до 6 колоний с тест штаммами и умеренным ростом с нативным материалом от 12 до 23 колоний. На вторые сутки количество колоний в чашках с нативным материалом увеличилось от 20 до 46 колоний.

По ростовым свойствам кровяной и кровяно-теллуритовые агары не уступают среде Бучина, но рост колоний формировался на фоне низких ингибирующих свойств по отношению к сопутствующей микрофлоре.

Низкими дифференцирующими свойствами обладает и сывороточный агар, где обнаружили обильный рост сопутствующей микрофлоры на вторые сутки.

Эффективность Нитритного агара и среды Сотона была самой низкой. Слегка заметное однородное помутнение обнаружили на средах через 48 часов.

Предлагаемая среда показала высокие дифференцирующие и ингибирующие свойства. Колонии появились на 1 сутки в количестве от 20 до 46 в чашках с тест штаммами и до 23 колонии с нативным материалом. На 2 сутки картина практически не изменилась, что является показателем высокой ингибирующей активности. Рост отличался не только числом, но и характером и размером колонии.

Таким образом, проведенные исследования показали, что среда, приготовленная на основе геотермальной воды, приводит к ускоренному росту коринебактерий на фоне высокой активности ингибирующей постороннюю микрофлору, что, в конечном итоге, показывает значительную эффективность. Кроме того, на изготовление среды не требуется ощутимых материальных затрат.

Корсаков Н.Т.

Магомедов М.З.

Ахмедов М.М.

Баратов М.О.

Нажалов М.И.

Вердиева Э.А.



5. 05. 2014 года

## Акт

Мы, ниже подписавшиеся в составе директора ГБУ РД «Ботлихская зональная ветеринарная лаборатория», к.в.н. Сакидибирова О.П., ветеринарного врача, серолога Рамазановой Х.Н., лаборанта Дибировой Х.Д., заведующего кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО ДагГАУ им М.М. Джамбулатова, Ахмедова М.М., заведующего лабораторией туберкулеза ПЗНИВИ к.в.н., Баратова М.О., научных сотрудников, Нажалова М.И., Вердиевой Э.А., произвели испытание универсальной питательной среды для выделения микобактериоподобных микроорганизмов (коринебактерий, нокардий и родококков).

Предлагаемую (универсальную) среду готовили следующим образом. Взяли панкреатический гидролизат кильки -31,7 г, Д-глюкозу-16,0 г,  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  - 0,17 г,  $\text{MgSO}_4$  -0,2 г, водный голубой -0,28 г, натрий углекислый -0,3 г  $\pm 0,05$ , агар микробиологический - 8,1 г  $\pm 1,0$  ( $\text{P}^{\text{H}}$  7,4 $\pm$ 0,2), добавили геотермальную воду до 1 литра и 5% стерильной дефибринированной крови животных. В процессе размешивания не допуская образование пены, вносили 4-5 капель смеси н-алканов (парафин), разлили в чашки Петри. После застывания среду слегка подсушили в термостате при температуре (37 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$  в течение 40-60 минут. Цвет готовой среды темно- синий. Хранили в холодильнике, использовали в течение 3-4 суток.

Оценку сред проводили посевом тест - штаммов и свежевыделенных культур коринебактерий, нокардий и родококков. В качестве музейного штамма использовали *Corynebacterium xerosis* N1911, *N.asteroides* ВКМ Ас 1077 и *R. bronchialis* ИМВ Ас 737. а нативным материалом служили лабораторные штаммы, выделенные из объектов внешней среды (почва, корма, навоз и кровь крупного рогатого скота).

Культуру каждого штамма высевали в 8 чашках Петри.

Для соблюдения равнозначности опыта материал высевали равными дозами (500 клеток в 0,1 мл.). Учитывали, скорость и интенсивность роста, величину колоний и ингибирующие к сопутствующей микрофлоре свойства. Результаты учитывали через 24 и 48 часов. Опыты повторялись двукратно.

По результатам проведенных исследований, предлагаемая среда показала высокие дифференцирующие и ингибирующие свойства. Колонии появились на первые сутки в количестве от 4 до 12 в чашках с тест штаммами и с нативным материалом. На вторые сутки обнаружили обильный рост в обеих чашках до 23 колонии, без сопутствующей микрофлоры, что является показателем высокой ингибирующей активности. Рост отличался не только числом, но и характером и размером колонии.

**Заключение.** Проведенные исследования показали, что универсальная среда (М-10), для микобактериоподобных микроорганизмов обладает хорошими ростовыми свойствами на фоне высокой активности

ингибирующей постороннюю микрофлору свойств. Кроме того, среда отличается от остальных вариантов по массивности выросших колонии, что в конечном итоге является показателем диагностической ценности и практической значимости универсальной среды.

Сакидибиров О.П.

Рамазанова Х.Н.

Дибирова Х.Д.

Ахмедова М.М.

Баратова М.О.

Нажалова М.И.

Вердиева Э.А.



6.09.2015 год

Утверждаю

Проректор по учебной работе ДагГАУ  
им. М.М. Джамбулатова профессор

Курбанов С.А.

09. 2016



### Справка

Об использовании в учебном процессе материалов докторской диссертации Баратова Магомеда Омаровича на тему: «Особенности туберкулеза КРС в РД» (эпизоотология, диагностика, дифференциальная диагностика и меры борьбы)

Результаты научно-исследовательской работы и докторской диссертации заведующего лабораторией туберкулеза ФГБНУ Прикаспийского ЗНИВИ к.в.н. Баратова М.О. внедрены в учебный процесс и используются при чтении лекций по курсу микробиология у студентов факультета ветеринарной медицины очного и заочного форм обучения.

Справка дана для предъявления в совет по защите диссертации

Декан факультета ветеринарной  
медицины, доцент

Гаджиев Б.М

Зав. кафедрой микробиологии,  
вирусологии и патанатомии,  
профессор

Ахмедов М.М.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ  
ПРАВИТЕЛЬСТВО РЕСПУБЛИКИ ДАГЕСТАН  
КОМИТЕТ ПО ВЕТЕРИНАРИИ  
РЕСПУБЛИКИ ДАГЕСТАН  
ИНН 0570001133 ОГРН 1100570001058

" 19 " сентября 2016 г.  
№ 20-01-15/25/16  
г.Махачкала

### Справка

О внедрении в практику научных исследований материалов докторской диссертации Баратова Магомеда Омаровича на тему: «Особенности туберкулеза КРС в РД» (эпизоотология, диагностика, дифференциальная диагностика и меры борьбы)

Результаты научных разработок заведующего лабораторией туберкулеза ФГБНУ Прикаспийского ЗНИВИ, к.в.н Баратова М.О. по усовершенствованию методов диагностики туберкулеза КРС используется в практических условиях в хозяйствах республики Дагестан.

Справка дана для предъявления в совет по защите диссертации

Зам руководителя Департамента  
по ветеринарии при МСХ в РД



*М. Шапиев*

Шапиев М. Ш.