

Министерство сельского хозяйства РФ
Новосибирский государственный аграрный университет
Институт экспериментальной ветеринарии Сибири
и Дальнего Востока Россельхозакадемии
Омский государственный аграрный университет

ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА ЖИВОТНЫХ

Монография

Новосибирск 2011

УДК 619:616.002.5:636

ББК 48.731.216

Д 44

А в т о р ы: А.С. Донченко, В.Н. Кисленко, Н.А. Донченко, Н.Л. Тупота, Н.М. Колычев, Л.М. Каримова

Р е ц е н з е н т ы: д-р вет. наук, проф. Н.А. Шкиль;
д-р вет. наук, проф. С.К. Димов;
д-р биол. наук, проф. В.А. Чхенкели

Утверждена и рекомендована к изданию научно методическим советом ветеринарного факультета НГАУ (протокол №34 от 7 февраля 2011 г.)

Д 44 **Диагностика туберкулеза животных** /А.С. Донченко, В.Н. Кисленко, Н.А. Донченко, Н.Л. Тупота, Н.М. Колычев, Л.М. Каримова; Новосиб. гос. аграр. ун-т. – Новосибирск, 2011. – 247 с.

ISBN

Монография состоит из трёх частей: методы диагностики туберкулёза; культурально-морфологические, биохимические и биологические методы дифференциации и идентификации микобактерий туберкулёза; молекулярные методы идентификации микобактерий туберкулёза. В ней представлены собственные материалы авторов и данные отечественной и зарубежной литературы, касающиеся как патогенных, так и атипичных микобактерий. Показана частота выделения микобактериальных культур из биологического материала, полученного от крупного рогатого скота, реагирующего на туберкулин для млекопитающих, из объектов внешней среды в хозяйствах Западной Сибири с различной эпизоотической ситуацией по туберкулёзу. Описаны лабораторные тесты и биологические признаки микобактерий, изолированных из биоматериала. Особое внимание уделено биохимическим и молекулярным методам дифференциации и идентификации микобактерий.

УДК 619:616.002.5:636

ББК 48.731.216

ISBN

© Новосибирский государственный
аграрный университет, 2011

ВВЕДЕНИЕ

В работе представлены накопленные авторами собственные материалы и данные отечественной и зарубежной литературы, касающиеся представителей как патогенных, так и атипичных микобактерий рода *Mycobacterium*. Авторами показана частота выделения микобактериальных культур из биологического материала, полученного от крупного рогатого скота, реагирующего на туберкулин для млекопитающих, с объектов внешней среды в хозяйствах Западной Сибири с различной эпизоотической ситуацией по туберкулезу. Описаны лабораторные тесты и биологические признаки микобактерий, изолированных из биоматериала. Особое внимание уделено методам дифференциации и идентификации, позволяющим определить родовую и видовую принадлежность выделенных культур с использованием различных питательных сред, биохимических тестов и при разных методах заражения лабораторных животных.

Проблема классификации и идентификации микобактерий занимает умы исследователей более ста лет, но до сих пор остается актуальной. В эпидемиологии и эпизоотологии туберкулеза проблема видов микобактерий имеет не только теоретическое, но и большое практическое значение, так как создает основу для успешного проведения комплекса противотуберкулезных мероприятий. Определение видовой принадлежности изолированных культур микобактерий позволяет более точно определить источники инфицирования здоровых животных, птиц или зверей. Предмет нашей работы – изучение микобактерий, изолированных из организма животных, реагирующих на туберкулин, и объектов внешней среды.

ЧАСТЬ 1. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

1. ПРИЖИЗНЕННАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА (аллергический метод)

Обнаружение у животного повышенной чувствительности замедленного типа к микобактериям и продуктам их распада является признаком, свидетельствующим о контакте с микобактериями и происходящих в нем иммунобиологических изменениях. Это явление используют как диагностический тест и определяют туберкулиновой пробой. Следует отметить, что туберкулин впервые получил не Р. Кох, как это указывается во многих руководствах, а латыш Х.И. Гельман, изготовивший аллерген в 1888 г. и только в 1892 г. опубликовавший в журнале «Архив биологических наук» технику изготовления препарата и результаты его испытания для диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота. Он же совместно с В.Г. Гутманом впервые разработал и внедрил в ветеринарную практику подкожный метод туберкулинизации крупного рогатого скота. Р. Кох изготовил туберкулин и сообщил об этом в 1890 г., этом же году независимо от Х.И. Гельмана и Р. Коха препарат изготовил в Варшаве О.Ф. Буйвид, давший ему название туберкулин, а материалы о нем опубликовал в 1891 г.

Основным методом аллергической диагностики туберкулеза является внутрикожная туберкулиновая проба, предложенная в 1907 г. Манту. По простоте выполнения и эффективности исследования она до настоящего времени не имеет себе равных. Возможность выявления животных в ранней стадии заражения, до образования у них патологических изменений в органах и тканях, являющихся источником возбудителя инфекции, делает его незаменимым при ликвидации болезни в стаде, особенно в новых случаях ее возникновения.

В нормальных условиях содержания и кормления зараженные животные, как правило, интенсивно реагируют на введение туберкулина. Эффективность исследования достигает 100%, что дает возможность при своевременном обнаружении заболевания выявить и удалить из стада всех инфицированных особей.

Имеются сообщения о том, что в начальный период после заражения возбудителем туберкулеза чувствительность организма животных к туберкулину выражена слабо и степень сенсибилизации повышается по мере прогрессирования туберкулезного процесса. Установлено на искусственно зараженных телятах и овцах, что наибольшая интенсивность реакции на туберкулин при ежемесячно проводимом исследовании наблюдалась через месяц после заражения и в дальнейшем постепенно снижалась, достигая через 4-6 мес 75-50% первоначального показателя. Безусловно, интенсивность реакции увеличивается в период от начала до полного развития повышенной чувствительности замедленного типа, но этот период короткий и заканчивается через 2-3 недели после заражения.

Эффективность туберкулиновой пробы в продолжительно неблагополучных стадах при значительном распространении болезни ниже, чем в свежеинфицированных. Это связано с наличием в таких стадах животных, находящихся в состоянии анергии вследствие прогрессирования туберкулезного процесса. Количество таких животных может достигать 25 и даже 60%. Одной из причин отсутствия реакции на туберкулин у некоторых больных туберкулезом животных является высокое содержание противотуберкулезных антител в их крови как признак высокой активности В-системы иммунитета. Известно, что кроме кооперации клеток Т- и В-систем иммунитета возможна их конкуренция. При этом в крайних позициях таких отношений можно наблюдать полное отсутствие реакции на туберкулин при наличии в крови специфических антител в высоких титрах, и, наоборот, отсутствие антител и проявление ярко выра-

женной чувствительности к туберкулину. Между этими позициями возможно множество промежуточных состояний, когда проявляются оба фактора (гуморальный и клеточный) с разной степенью интенсивности аллергических и серологических реакций. Такое положение характерно для хронических болезней с внутриклеточным развитием возбудителя и свидетельствует о необходимости использования и аллергического, и серологического методов исследования на туберкулез. Примером успешного их применения являются бруцеллез, паратуберкулез, сап. С этой целью при туберкулезе использовали различные серологические пробы (РСК, РНГА, РП и др.), но в силу малой чувствительности они не нашли широкого применения в ветеринарной практической работе.

До 60-х годов результаты туберкулиновой пробы были решающими при определении состояния стада по туберкулезу. На фоне значительного распространения болезни ошибки были редкими, у реагирующих животных, как правило, обнаруживали туберкулез.

Однако проявление неспецифических реакций на туберкулин привело к потере решающего значения этой пробы при определении состояния стада по туберкулезу и сделало ее ориентировочной при первичной постановке диагноза.

Современная эпизоотология различает две группы неспецифических реакций на туберкулин: парааллергические и псевдоаллергические.

Парааллергические реакции на туберкулин – это реакции, вызванные атипичными сапрофитными микобактериями, микобактериями паратуберкулеза и птичьим видом возбудителя туберкулеза.

Псевдоаллергические реакции на туберкулин – реакции, вызванные факторами немикобактериальной природы. Сенсibilизация организма к туберкулину проявляется при актиномикозных поражениях, гельминтозных заболеваниях, септических явлениях.

Имеющиеся данные показывают, что проявление ре-

акции на туберкулин у скота благополучных хозяйств является глобальной проблемой, обусловленной изменением системы ведения животноводства, его интенсификацией, ведущей к высокой концентрации животных на ограниченных площадях, снижению резистентности организма, воздействию стрессовых факторов и др. Обследование скота благополучных хозяйств разных районов страны с применением видовых микобактериальных аллергенов показало практически повсеместное распространение сенсибилизации, которая в отдельных случаях достигает 98% обследованных животных. В то же время количество животных, реагирующих на туберкулин для млекопитающих, различно и зависит от зоогигиенического уровня содержания и кормления скота: при его снижении количество таких животных достоверно увеличивается.

Многочисленные данные отечественных и зарубежных исследователей показывают, что основной, а возможно, и единственной причиной проявления реакции на туберкулин у скота благополучных хозяйств является сенсибилизация животных атипичными микобактериями. О распространении атипичных микобактерий и их видовом составе в той или иной зоне судят по данным бактериологических исследований. В регионе Западной Сибири, в частности Новосибирской области, причиной парааллергических реакций на туберкулин являются атипичные микобактерии *M. fortuitum* и *M. smegmatis*.

Другим методом является сравнительное изучение специфических кожных аллергических реакций со стандартным туберкулином для млекопитающих и сенситинами из атипичных микобактерий. Определение степени распространения сенсибилизации скота атипичными микобактериями с помощью бактериологического исследования материала от животных и объектов окружающей среды или обследованием животных с применением одного туберкулина не отражают истинной картины, так как атипичные микобактерии распространены повсеместно. Однако не все их виды

обладают сенсibiliзирующими свойствами, а проявление реакции на туберкулин для млекопитающих зависит от уровня сенсibiliзации организма животного. Установлено, что у животных, сенсibiliзированных атипичными микобактериями, реакции на туберкулин проявляются только при высокой степени сенсibiliзации, характеризующейся значительной интенсивностью реакций на аллерген из атипичных микобактерий.

Определение степени сенсibiliзации скота атипичными микобактериями с помощью аллергических исследований является ориентировочным методом по сравнению с бактериологической диагностикой. Как указывалось выше, проявление реакции на туберкулин у животных благополучных по туберкулезу хозяйств сделало туберкулиновую пробу ориентировочной при определении состояния стада по этой болезни и вызвало необходимость применения дополнительных методов диагностики. Решающими в диагностике туберкулеза стали патолого-анатомический и бактериологический методы исследований, и положительные результаты туберкулиновой пробы при плановом обследовании скота в благополучных хозяйствах требуют подтверждения или исключения заболевания этими методами диагностики. Туберкулез считают установленным при обнаружении у животных на вскрытии характерных изменений или выделении возбудителя туберкулеза.

Выделение из материала атипичных микобактерий не может свидетельствовать о благополучии животных по туберкулезу в связи с возможностью одновременного нахождения в нем возбудителя туберкулеза и указанных микобактерий. Нам приходилось наблюдать случаи смешанной инфекции, когда в посевах материала с туберкулезными изменениями на питательной среде наблюдался вначале обильный рост атипичных микобактерий, а затем на оставшихся свободных участках среды образовались колонии возбудителя туберкулеза.

Диагностическое значение имеет только наличие или

отсутствие в исследуемом материале возбудителя туберкулеза. В то же время отрицательные результаты бактериоскопического исследования не всегда подтверждают отсутствие туберкулеза. Следовательно, диагностический убой и бактериологическое исследование в некоторых случаях не подтверждают туберкулез даже при его наличии, вследствие чего происходит распространение болезни в стаде.

Общепринятым методом аллергического исследования крупного рогатого скота на туберкулез считается внутрикожное введение туберкулина для млекопитающих в дозе 0,2 мл (10000 МЕ), учет реакции проводится через 72 ч, аллерген вводят в среднюю треть шеи безыгольным инъектором БИ-7М. Быкам-производителям туберкулин вводят в подхвостовую складку. Реагирующими животные считаются при увеличении кожной складки на 3 мм и более.

Свиньям применяют два аллергена – в кожу основания одного уха вводят ППД-туберкулин для млекопитающих, в другое – ППД-туберкулин для птиц в дозе 10000 МЕ в 0,2 мл объема. Учет проводят через 48 ч. У основания ушной раковины реакция проявляется в виде плотной или тестообразной припухлости кожи размером 20-40 мм и более.

Козам, овцам, собакам туберкулин вводят в области внутренней поверхности бедра, учет реакции проводят через 48 ч.

Курам туберкулин вводят в бородку, учет реакции проводят через 36 ч.

Кроме внутрикожной туберкулиновой пробы, в практике используют офтальмо- и внутривенную пробы. Эти методы исследований на туберкулез сравнительно широко применяли ранее, в период отработки аллергической диагностики болезни. Широкое испытание в практических условиях каждого метода определило его место в общей системе диагностики туберкулеза. В дальнейшем, с переводом животноводства на промышленную основу и увеличением концентрации скота в хозяйствах, эти методы потеряли свое первоначальное значение вследствие недостаточной эффек-

тивности и трудности массового использования. Однако в ряде случаев, особенно при затруднениях в определении состояния стада или отдельных животных по туберкулезу, они находят применение. Офтальмопроба, предложенная Валле для исследования крупного рогатого скота (1907 г.), является достаточно эффективной в диагностике туберкулеза. По этому показателю она уступает внутрикожной пробе, но дополнительно к последней выявляет 5-7% зараженных животных. Реакция конъюнктивы у зараженных животных на воздействие туберкулина возникает и протекает быстро – в течение нескольких часов, однако в основе ее лежит тот же клеточный механизм, а скорость возникновения реакции следует объяснить наличием очень развитой сосудистой сети глаза, обеспечивающей концентрацию и быстрый выход сенсibilизированных лимфоцитов в зону воздействия аллергена. В то же время на возникновение этой реакции влияют гуморальные факторы, что подтверждается быстро развивающимся отеком конъюнктивы и таким же быстрым исчезновением воспалительных явлений, чего не может быть при клеточной инфильтрации тканей.

Глазную туберкулиновую пробу рекомендовано проводить крупному рогатому скоту старше 6 лет. Ее проводят двукратно с интервалом 5-6 дней между первым и вторым введением туберкулина. Препарат наносят в количестве 3-5 капель на конъюнктиву при оттянутом нижнем веке. Учет результатов офтальмопробы проводят через 3, 6, 9 и 12 ч после повторного введения туберкулина. Реакция характеризуется выделением из внутреннего угла слизисто-гнойного или гнойного секрета, накапливающегося вначале в конъюнктивальном мешке, а затем вытекающего в виде шнура.

Внутривенное введение туберкулина у зараженных животных вызывает общую системную реакцию, клинически проявляющуюся повышением температуры тела, учащением пульса и дыхания, угнетением общего состояния животного и некоторыми другими внешними изменениями. Эти явления достигают максимума развития через 6-8 ч и

исчезают через 20-24 ч. У некоторых животных, особенно с активным туберкулезным процессом, после внутривенной инъекции туберкулина развивается шоковое состояние, которое может закончиться гибелью. На вскрытии у таких животных обнаруживают множественные кровоизлияния в брюшной и грудной полостях, кровенаполненность печени и селезенки, изменения в легких. По наиболее часто используемой методике исследования внутривенной пробой у животного предварительно определяют среднюю температуру тела, измеряя ее утром, днем и вечером. Затем внутривенно вводят 5000 МЕ туберкулина в 1 мл физиологического раствора на каждые 100 кг массы животного и измеряют температуру тела через каждые 3 ч в течение 9-12 ч. Реагирующими считают животных с повышением на 0,9-1°C и более против средней. Измерять температуру тела необходимо каждые 3 ч в течение 9 ч после инъекции аллергена.

Для применения аллергических методов исследования имеется ряд противопоказаний. Так, не следует вводить туберкулин животным в течение трех недель после вакцинации их против инфекционных болезней, в особенности против сибирской язвы, эмкара и др. Подкожную и внутривенную пробы нельзя применять при повышенной температуре тела, а также для исследования самок во второй половине беременности, офтальмопробу – при конъюнктивитах или других заболеваниях глаз, а также при возможности возникновения конъюнктивитов (пастбищное содержание). Нельзя исследовать также животных в состоянии переохлаждения и перегрева, поскольку в первом случае возможно подавление реакции, а во втором – развитие ее. После перегонов и перевозок животные должны отдохнуть не менее суток. Нельзя вводить туберкулин в кожу, если в ней и в подкожной клетчатке в области шеи имеются какие-либо изменения (рубцы, уплотнения, абсцессы, раны, поражения грибами, клещами или гельминтами). Введение лекарственных веществ и вакцин в области шеи вызывает морфологические и функциональные изменения тканей в этой зоне, что может

угнетать туберкулиновую реакцию или, наоборот, неспецифически повышать чувствительность кожи к туберкулину.

Как уже отмечено, в настоящее время прижизненная диагностика туберкулеза затруднена из-за широкой распространенности атипичных (нетуберкулезных) микобактерий, сенсibiliзирующих животных к туберкулину. Для дифференциации специфических и неспецифических (точнее, параспецифических) реакций в благополучных хозяйствах применяют симультанную пробу с туберкулином и комплексным аллергеном из атипичных микобактерий (КАМ). Реакции оказываются более выраженными на аллерген, родственный по антигенному составу тем микобактериям, которые вызвали аллергию у животных. Повысилась значимость постоянного комплексного эпизоотологического контроля благополучия ферм и хозяйств. При этом учитываются не только результаты плановых аллергических исследований и данные лабораторных анализов, но и результаты экспертизы на мясоперерабатывающих предприятиях, при внутрихозяйственном убое животных, контрольном убое реагирующих на туберкулин, вскрытиях трупов. Повысилась значимость учета данных медицинского обследования работников животноводческих ферм. Если в благополучном хозяйстве при проведении плановых аллергических исследований крупного рогатого скота выявляют реагирующих животных, их дополнительно исследуют офтальмо- или внутривенной туберкулиновой пробой. Реагирующих на эти пробы подвергают комиссионному диагностическому убою. При обнаружении типичных для туберкулеза патологических изменений диагноз считают установленным. Если характерные изменения органов и тканей не обнаружены, проводят бактериологическое исследование биоматериала от убитых животных. При выделении культур микобактерий бычьего, человеческого видов или положительной биопробе диагноз также считают установленным. Если реакции на офтальмо- и внутривенную пробы отрицательны, всех животных стада проверяют симультанной аллергической про-

бой. В случае подтверждения факта сенсибилизации животных атипичными микобактериями стадо считают благополучным по туберкулезу и последующие плановые исследования проводят с применением симультанной пробы. Но в Сибирском регионе, в частности в Новосибирской области, атипичные микобактерии по антигенному составу не соответствуют КАМ, и в данном случае результат будет всегда неопределенный. Для дифференциации неспецифических туберкулиновых реакции в нашем регионе применяют повторное исследование животных через 30 дней половинной дозой туберкулина (5000 МЕ). При таком исследовании наблюдается феномен выпадения неспецифических реакций и в данном случае реагируют только больные туберкулезом животные.

С учетом результатов испытания внутрикожной туберкулиновой пробой, в основу схемы дифференциальной диагностики неспецифических реакций и туберкулеза у крупного рогатого скота положен достоверный выбор животных для диагностического убоя по следующим взаимодействующим и усиливающим друг друга критериям:

- пониженная реактивность организма животных, сенсибилизированных факторами немикобактериальной этиологии, к туберкулину в дозе 5000 МЕ. Достоверный контроль теста – совпадение в подавляющем большинстве реакций на дозы туберкулина 10000 и 5000 МЕ у больного туберкулезом крупного рогатого скота;

- выпадение реакций на внутрикожное введение туберкулина у животных, сенсибилизированных факторами немикобактериальной этиологии.

Контролем достоверности этой пробы является невыпадение реакций в этот срок у больных туберкулезом животных. Согласно схеме, поголовье крупного рогатого скота благополучной по туберкулезу фермы исследуют с профилактической целью туберкулиновой пробой в обычном порядке – два раза в год. При выявлении единично реагирующих на туберкулин (до 10 голов) убивают всех животных с

последующей тщательной ветеринарно-санитарной экспертизой внутренних органов, лимфатических узлов и бактериологическим исследованием биоматериала.

При установлении туберкулеза проводят оздоровительные мероприятия в соответствии с «Инструкцией о мероприятиях по профилактике и ликвидации туберкулеза животных» (1988). Если при аллергическом исследовании выявляют более 10 реагирующих на туберкулин животных, убивают 2-3 головы с наиболее выраженными реакциями и далее поступают как изложено выше. Остальных реагирующих на туберкулин животных (если туберкулез не подтвержден у убитых животных на вскрытии) через 30 дней переисследуют туберкулином в дозе 5000 МЕ. При этом безыгольный инъектор (БИ-7, МБИ) регулируют на введение стандартного разведения аллергена в объеме 0,1 мл. Далее проводят отбор животных для контрольного диагностического убоя. В первую очередь отбирают животных, давших при переисследовании реакцию на введение уменьшенной дозы туберкулина с наибольшей интенсивностью – максимальным утолщением кожной складки. Если имеются данные, учитывают повторяемость проявления туберкулиновых реакций у одних и тех же животных за ряд предыдущих исследований. При диагностическом убое животных ветеринарно-санитарной экспертизе подвергают лимфатические узлы (заглоточные, подчелюстные, бронхиальные, средостенные, предлопаточные, мезентериальные, надвыменные и др.), внутренние органы и отбирают пробы биоматериала для бактериологического исследования. Если комплексными исследованиями туберкулез исключен, туберкулиновые реакции считают неспецифическими, а ферму (стадо) – благополучной по туберкулезу. Реагирующих на туберкулин животных оставляют в стаде, а продукцию от них – молоко, мясо, приплод – используют без ограничений. Из данной фермы допускается реализация племенного поголовья, не реагирующего на внутрикожное введение туберкулина. Если при последующих профилактических исследованиях

вновь выявляются реагирующие на туберкулин животные, благополучие фермы (стада) по туберкулезу контролируют по изложенной схеме.

В случаях выявления свойственных туберкулезу изменений в органах и тканях убитых на мясо животных из благополучных хозяйств в двухнедельный срок исследуют все поголовье соответствующего стада в целях подтверждения или исключения туберкулеза. При выявлении в благополучном хозяйстве реагирующих на туберкулин свиней, коз и овец проводят диагностический убой 3-5 животных с наиболее выраженными реакциями. Независимо от наличия или отсутствия патологических изменений отбирают материал для бактериологического исследования. В случае выделения культур микобактерий бычьего, человеческого видов или положительной биопробы туберкулез считают установленным. Если у павшей, убитой на мясо или убитой реагировавшей на туберкулин птицы обнаруживают свойственные туберкулезу патологические изменения, делают бактериоскопию биоматериала.

2. ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

В соответствии с наставлением по диагностике туберкулеза у животных, наряду с аллергическим и бактериологическим, применяют патоморфологический метод исследования – патолого-анатомическое вскрытие и гистологическое исследование. К нему прибегают в случаях, когда в благополучном по туберкулезу стаде крупного рогатого скота плановой туберкулиновой пробой выявляют реагирующих животных. Их убивают с последующим осмотром внутренних органов и лимфатических узлов. При подозрении на туберкулез в хозяйстве можно произвести так называемый контрольный убой подозреваемого в заболевании туберкулезом животного. Как правило, его осуществляют на санитарной бойне и только в некоторых случаях (при соблюдении всех ветеринарно-санитарных требований) – в

хозяйствах. Основная задача вскрытия – обнаружение типичных для туберкулеза изменений. Изъятые из туши органы раскладывают на столе и подробно осматривают. Легкие разрезают на узкие полоски и прощупывают. Каждый обнаруженный при этом узелок вырезают вместе с окружающей тканью и откладывают для гистологического и бактериологического исследований. Так же поступают и с лимфатическими узлами, печенью, селезенкой и почками.

В результате активного проведения мероприятий по ликвидации туберкулеза крупного рогатого скота на вскрытии при диагностическом убое обнаруживают только локальные изменения, в основном в регионарных лимфатических узлах, а иногда их совсем не выявляют. В стадах, где после проверки туберкулином всех реагирующих животных удаляют, у них при контрольном убое на вскрытии изменения встречаются редко. Чувствительность к туберкулину у инфицированных животных имеется, но изменения в органах не успевают развиваться. При тщательном патолого-анатомическом исследовании иногда удается выявить мелкие туберкулезные узелки, чаще в регионарных лимфатических узлах (бронхиальных или средостенных) либо в легочной ткани по ходу мелких бронхов. В стадах, длительно неблагополучных по туберкулезу, где больных животных не изолируют, у реагирующих на туберкулин особей в органах и лимфатических узлах на вскрытии обнаруживают характерные для этой инфекции и весьма разнообразные изменения, которые имеют вид различной величины бугорков, содержащих на разрезе казеозную массу с отложениями извести, окруженных соединительнотканной капсулой. Они настолько типичны, что их обнаружение подтверждает диагноз на это заболевание. В легких различают милиарный туберкулез, при котором в их ткани рассеяны множественные плотные узелки величиной с просыное зерно. Они вначале полупрозрачные, затем мутнеют, что связано с развитием некроза. При прогрессировании процесса узелки увеличиваются в размерах. В дальнейшем туберкулезный процесс

захватывает все более крупные участки легких, проявляясь в виде ацинозно-нодозной, лобулярной или лобарной бронхопневмонии. При ацинозно-нодозной пневмонии поражаются отдельные ацинусы или их группы, при лобулярной – дольки, а при лобарной – целые доли легких. Все отмеченные поражения легких обязательно приводят к изменениям в бронхиальных и средостенных лимфатических узлах. В других органах и лимфатических узлах туберкулезные изменения развиваются при генерализации туберкулезной инфекции. В печени встречаются бугорки, содержащие казеозную массу с отложением извести и окруженные соединительнотканной капсулой. Селезенка и почки поражаются редко. При поражении серозной оболочки грудной и брюшной полостей развивается «жемчужница». В случае туберкулеза вымени находят плотные бугорки, заполненные обызвествленной казеозной массой. Чаще поражена задняя часть вымени. Туберкулезные изменения обнаруживают и в регионарных лимфатических узлах, поэтому осмотру их необходимо уделять большое внимание на вскрытии. Обычно узлы увеличены, плотные, бугристые, на разрезе содержат различной величины узелки и бугорки с наличием казеозной массы с отложением извести и окружены соединительнотканной капсулой.

Мелкие туберкулезные изменения в органах необходимо отличать от узелков паразитарного, микотического и другого происхождения. Микозные гранулемы на вскрытии иногда трудно отличить от туберкулезных, поэтому в таких случаях требуется гистологическое исследование. Паразитарные узелки и актиномикомы содержат легко вылушиваемую некротическую массу, внутренняя поверхность капсулы таких узелков гладкая и блестящая.

У овец и коз, зараженных возбудителем туберкулеза бычьего вида, изменения мало отличаются от наблюдаемых у крупного рогатого скота. Овцы редко заражаются туберкулезом, туберкулезные очаги у них встречаются реже, они рано подвергаются обызвествлению и окружены более вы-

раженной соединительнотканной капсулой. У коз при поражении легких нередко обнаруживают каверны.

Лошади заражаются туберкулезом очень редко, у них при заражении возбудителем туберкулеза бычьего вида первичный очаг возникает в миндалинах или в заднем отделе тонкого кишечника, откуда инфекция по лимфатическим путям распространяется в лимфатические узлы головы (заглоточные и подчелюстные), бронхиальные и средостенные, а также в брыжеечные. На слизистой оболочке кишечника образуются язвы. При гематогенной генерализации чаще поражаются легкие, а печень и селезенка – редко.

У крупного рогатого скота, овец, коз и лошадей при заражении возбудителем туберкулеза человеческого и птичьего видов изменения встречаются очень редко и в основном в регионарных лимфатических узлах.

Свиньи восприимчивы ко всем видам возбудителей туберкулеза и к микобактериям *M. intracellulareae*. Они в основном заражаются через рот, поэтому первичные очаги располагаются в лимфатических узлах головы и брыжейки. При заражении свиней возбудителем туберкулеза бычьего вида изменения могут быть обнаружены в легких, печени, селезенке и очень редко на серозных покровах. У свиней, зараженных возбудителем туберкулеза человеческого вида, изменения менее выражены, а в случае заражения микобактериями комплекса *avium-intracellulareae* поражаются лимфатические узлы брыжейки, реже головы. В этом случае изменения ее отличаются от вызываемых возбудителем туберкулеза бычьего вида.

При отсутствии на вскрытии изменений, а также при неясно выраженных или не характерных для туберкулеза отбирают материал для лабораторного исследования, который желательно брать от каждого вскрытого животного. Берут кусочки размером 1 x 3 см из легких, печени, селезенки и лимфатических узлов – бронхиальных, средостенных, подчелюстных, заглоточных, порталных, надвыменных, брыжеечных, парные лимфатические узлы – с обеих сторон

туши; у птицы – печень, селезенку, кишечник, яичники или тушку целиком.

Для бактериологического исследования отобранный материал консервируют в 30%-м стерильном глицерине, для гистологического – в 10%-м растворе формалина. В обоих случаях необходимо, чтобы консервирующей жидкости было в 10 раз больше объема кусочков. В холодное время года только для бактериологического исследования допускается пересылка материала в замороженном виде. В каждую банку вкладывают этикетку с номером (кличкой) животного, наименованием хозяйства и датой вскрытия, написанную черным карандашом на кусочке плотной белой бумаги. На направляемый в лабораторию материал пишут сопроводительный документ установленной формы, в котором указывают причины контрольного убоя, результаты туберкулинизации и вскрытия животного.

Гистологическое исследование дает возможность выявить типичные для туберкулеза изменения. Несмотря на многообразие туберкулезного процесса, во всех случаях обнаруживают очаг некроза, вокруг которого расположена зона эпителиоидных и отдельных гигантских клеток, окруженных лимфоидными клетками и соединительнотканной капсулой. В казеозной массе находятся отложения извести. В эпителиоидных клетках и в казеозной массе можно обнаружить возбудителя туберкулеза в окрашенных по Цилю-Нильсену срезах. Обнаруженные типичные для туберкулеза гистологические изменения дают основание для постановки предварительного диагноза на туберкулез. Окончательный диагноз ставят по результатам бактериологического исследования с применением биопробы для установления вида возбудителя туберкулеза.

3. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Бактериологическое исследование материала и идентификация выделенных культур микобактерий имеют ре-

шающее значение для правильной оценки эпизоотической ситуации и проведения оздоровительных мероприятий, тем более что туберкулез крупного рогатого скота может протекать в форме латентного микробизма, когда в организме отсутствуют патолого-анатомические изменения, хотя животное заражено возбудителем туберкулеза. Кроме того, без этого метода исследований не обойтись и на последнем этапе ликвидации туберкулеза в хозяйстве, когда животные реагируют на туберкулин, а на вскрытии не наблюдают характерных для туберкулеза изменений. Лабораторная диагностика туберкулеза в настоящее время необходима и в связи с сенсibilизацией сельскохозяйственных животных и птицы атипичными микобактериями. Только бактериологический метод исследований материала от животных и птицы, павших или убитых с диагностической целью, дает возможность достоверно установить причину сенсibilизации их к туберкулину. При бактериологическом исследовании используют бактериоскопический, культуральный и биологический методы. Преимущество бактериоскопического метода состоит в скорости и легкости его проведения. Однако при бактериоскопии мазка микобактерии могут быть обнаружены только в случае, если их количество в 1 мл патологического материала составляет 100000 и более. Кроме того, он не позволяет дифференцировать вид находящихся в мазке микобактерий.

Культуральный метод имеет ряд преимуществ перед бактериоскопическим, поскольку с его помощью можно выделить из патологического материала культуру микобактерий, если в 1 мл его имеется 20-100 микобактерий. Он дает возможность также выделить чистую культуру микобактерий и определить видовую принадлежность, что имеет большое значение в эпизоотологии туберкулеза. Недостаток культурального метода обусловлен продолжительностью роста видимых колоний микобактерий. Кроме того, при обработке патологического материала с целью уничтожения побочной микрофлоры маложизнеспособные микобактерии погибают, и посевы дают отрицательные результаты.

Наиболее чувствительным из вышеперечисленных методов является биологический, позволяющий обнаружить туберкулез у исследуемого животного, даже если во взятом материале (1 мл) имеются лишь единичные экземпляры микобактерий. Однако бывают случаи, когда из-за снижения вирулентности микобактерий туберкулеза для лабораторных животных под влиянием химиопрепаратов посев из патологического материала может дать положительный результат при отрицательном исходе биопробы.

Из сказанного можно заключить, что ни один из перечисленных методов не обеспечивает в настоящее время получения достоверного ответа, и только комплексное их применение позволяет поставить правильный диагноз.

Бактериоскопический метод. С целью обнаружения в исследуемом материале кислото-, спиртоустойчивых микобактерий применяют бактериоскопический метод. Материалом для такого исследования являются пораженные ткани, мокрота, молоко, фекалии, гной, моча и сперма животных, а также объекты внешней среды. Патологический материал для исследования в лабораторию доставляют в свежем виде в стерильной посуде. В летнее время его можно отправлять в термосе со льдом. Допускается также консервация проб 30%-м стерильным водным раствором химически чистого глицерина. Пробы молока берут из всех четвертей вымени в количестве 150-200 мл. Перед взятием их вымя обмывают теплой водой с мылом, дезинфицируют 50 %-м этиловым спиртом, протирают стерильной ватой или свежепроглаженным полотенцем. Первые струи молока выдаивают в отдельную посуду, а последующие – в стерильную бутылку. Для взятия мокроты полость рта коровы освобождают от остатков корма, принудительно выпаивая ей бутылку воды. Затем для вызывания кашля нос и рот животного обматывают куском полотна, сжимая при этом носовые отверстия, и надавливают на гортань. После кашля на полотне остается немного мокроты, которую собирают в стерильную пробирку и закрывают стерильной резиновой пробкой. Кроме

указанного метода, имеются еще и другие способы отбора мокроты, но они более трудоемки.

Микобактерии обнаруживают в виде тонких прямых или изогнутых красных палочек. При обнаружении в препаратах-мазках кислотоустойчивых палочек их принадлежность к микобактериям туберкулеза следует подтвердить с помощью культурального и биологического методов. Положительный результат бактериоскопического исследования при световой микроскопии не дает возможности достоверно установить диагноз на туберкулез, поскольку, кроме микобактерий туберкулеза, в препаратах-мазках, окрашенных по Цилю-Нильсену, в красный цвет окрашиваются атипичные микобактерии и возбудитель паратуберкулеза. Особенно часто в них встречаются атипичные микобактерии. Последние отличаются от микобактерий туберкулеза морфологическими и тинкториальными особенностями. Это более толстые, грубые, короткие (или длинные) незернистые палочки. Однако морфологические признаки микобактерий нестабильные, они изменяются в зависимости от многих факторов. Поэтому чрезвычайно трудно бактериоскопически дифференцировать атипичные микобактерии от возбудителей туберкулеза. Иногда важно знать, находятся ли в препарате живые микобактерии или погибшие. Решить такой вопрос невозможно путем окраски их по Цилю-Нильсену. Для этой цели предложен цитохимический метод определения жизнеспособности микобактерий. Он заключается в различной окрашиваемости нативной и деполимеризованной ДНК микробной клетки.

Культуральный метод. В основе этого метода лежит способность микобактерий к размножению *in vitro* на питательных средах. В результате размножения отдельных микобактерий на питательной среде образуются видимые простым глазом колонии.

Цель культурального исследования – выделение из патологического материала культуры микобактерий и определение ее вида. Открытие возбудителя туберкулеза Р. Кохом

в 1882 г. оказалось возможным в результате разработки питательных сред для выращивания культуры микобактерий туберкулеза и их окраски. Однако продолжительное время выделение чистых культур микобактерий из патологического материала удавалось с большим трудом из-за загрязнения питательных сред быстрорастущей посторонней микрофлорой. Лишь после открытия Левенштейном и Сумиоши (1924 г.) возможности использования небольших концентраций кислот и щелочей для уничтожения побочной микрофлоры без ущерба для находящихся в патологическом материале микобактерий появилась возможность выделения чистых культур. При культуральном исследовании большое значение имеет предпосевная обработка исследуемого материала. Известно, что при обработке патологического материала для уничтожения побочной микрофлоры часть микобактерий погибает. Поэтому следует использовать такие вещества и в таких концентрациях, которые оказывали бы минимальное губительное действие на микобактерии и максимальное – на побочную микрофлору. В настоящее время для обработки патологического материала перед посевом на питательные среды используют следующие методы: Гона, Левенштейна, Сумиоши и др.

Особенности роста культур микобактерий туберкулеза на различных средах. Появление первичного роста микобактерий туберкулеза на различных питательных средах во многом зависит от количества и жизнеспособности микобактерий, находящихся в исследуемом материале. Для нормального роста культур микобактерий большое значение имеют наличие достаточной влажности среды, а также соответствие и постоянство температуры и pH среды. *M. bovis* в первой генерации растет на плотных яичных средах скудно. Рост появляется обычно на 30-60-е сутки в виде мелких круглых, влажных, почти прозрачных колоний цвета слоновой кости (R-форма). Оптимальная температура роста 37 - 38°C. Глицерин задерживает рост культуры, поэтому на плотных яичных средах, содержащих глицерин, она растет

очень плохо или вообще не растет. На мясопептонном агаре и бульоне, а также на яичных средах при комнатной (18-22°C) и повышенной (45°C) температуре культура не растет. Поскольку *M. bovis* является микроаэрофилом, то на среде Сотона с сывороткой и агаром колонии микобактерий растут на глубине 9 - 20 мм от поверхности среды. На жидких питательных средах они образуют нежную пленку. При пассаже культура растет быстрее (на 15-30-е сутки инкубации).

M. tuberculosis растет в первой генерации медленно. На плотных яичных средах рост появляется на 20-30-е сутки в виде сухих, неправильной формы колоний, напоминающих бородавки или миниатюрные кочаны цветной капусты (R-форма). В редких случаях колонии могут быть гладкими (S-форма). Оптимальная температура роста 37-38°C. Глицерин содействует росту культур. На безглицериновой плотной яичной среде растет скудно или вообще не растет. На мясопептонном агаре и бульоне, а также при комнатной и повышенной (45°C) температуре не растет.

M. tuberculosis – аэроб, на среде Сотона с сывороткой и агаром растет на поверхности или в верхних слоях среды. На жидких питательных средах рост микобактерий появляется к 15-30-м суткам инкубации в виде мелких крупинок на дне пробирки в прозрачной среде или в виде пленки на поверхности жидкости, которая затем утолщается и приобретает морщинистый вид. Достигнув стенки пробирки, пленка поднимается по стеклу. На картофельной среде Павловского *M. tuberculosis* дает плотный рост – толстые складчатые слои, а на глицериновой воде – в виде пленки.

Как *M. bovis*, так и *M. tuberculosis* при выращивании в кровяной или полусинтетической средах на предметных стеклах начиная с 7-х суток инкубации образуют характерные микроколонии в виде кос или жгутов, которые в дальнейшем заметно увеличиваются, образуя сплетения жгутов или кос. Образование жгутов и кос обусловлено корд-фактором, способствующим склеиванию микобактерий, и наблюдается почти без исключения только у штаммов *M. bovis* и *M. tuberculosis*.

M. avium растет на плотных яичных средах в первой генерации начиная с 20-х суток инкубации в виде гладких, влажных, блестящих колоний (S-форма) цвета слоновой кости. У культур старше 1,5-2 мес появляются кольцообразные колонии с валикообразными краями. *M. avium* растет как при 37-38°C, так и при 45°C и очень часто – при комнатной температуре (18-22°C). При длительном хранении, в частности на свету и при комнатной температуре, культуры могут окрашиваться в желтый цвет. Примерно половина штаммов *M. avium* растет на мясопептонном агаре и бульоне. В жидких питательных средах штаммы *M. avium* на дне пробирки образуют микроколонии в виде ватообразного осадка. При микроскопировании микроколоний в препаратах-мазках обнаруживают звездчатые или отдельные округлые кучки с беспорядочно расположенными палочками. При пассаже рост культуры появляется на 10-14-е сутки инкубации в виде влажного налета цвета слоновой кости.

Характерными особенностями наиболее часто встречающихся атипичных микобактерий являются скорость роста и температурный режим. Большинство атипичных микобактерий растут при 25-45°C и первичный рост наблюдается на 2-10-й день после посева.

В заключение следует отметить, что результат бактериологического исследования на туберкулез зависит от многих факторов. Так, большое значение имеет правильность и своевременность отбора патологического материала. Для лабораторного исследования следует отбирать заглочные, подчелюстные, средостенные, порталные, брыжеечные, в том числе находящиеся в области илеоцекального соединения и подвздошной кишки, надвыменные, предлопаточные и коленной складки лимфатические узлы, а также кусочки органов с подозреваемыми на туберкулез изменениями.

На высеваемость микобактерий оказывает влияние также качество питательных сред. Поэтому для получения более достоверного результата при исследовании патологического материала желательно использовать две разные среды.

Следует также подчеркнуть, что от одного животного иногда удается одновременно выделить две разные культуры микобактерий. Поэтому при выделении из исследуемого материала культуры быстрорастущих микобактерий бактериологическое исследование необходимо продолжать до 3 мес, чтобы не пропустить роста медленно растущих микобактерий, в том числе и микобактерий туберкулеза.

4. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологический метод является наиболее чувствительным при выявлении микобактерий туберкулеза. Диагностику туберкулеза проводят на морских свинках и кроликах, а при дифференциации возбудителя туберкулеза птиц – на курах. Морские свинки высокочувствительны к возбудителю туберкулеза крупного рогатого скота и человека даже тогда, когда в инъецируемом материале находятся лишь единичные микобактерии. Наиболее часто в лабораторной практике применяют подкожное заражение морских свинок, внутривенное – кроликов и кур. Характер процесса, развивающегося в организме лабораторных животных, зависит не только от вирулентности возбудителя, дозы заражения и путей введения возбудителя, но и от резистентности макроорганизма. Поэтому для исключения ошибки каждым материалом необходимо заражать не менее двух животных. Для обнаружения в патологическом материале микобактерий туберкулеза используют морских свинок. С этой целью к оставшемуся от посева обработанному патологическому материалу (осадку) добавляют 1-2 мл физиологического раствора, хорошо перемешивают и 1 мл взвеси вводят морским свинкам подкожно в паховую область. После введения морским свинкам материала, содержащего микобактерии бычьего вида, примерно через месяц после заражения на месте введения прощупываются увеличенные лимфатические узлы и иногда образуется язва, не заживающая до конца жизни животного. Морские свинки теряют в

массе. Если они не погибают раньше, то находятся в опыте на протяжении 3 мес, после чего их убивают и вскрывают. При развитии специфического процесса в органах морских свинок наблюдают генерализованный туберкулез. В области паха обнаруживают увеличенные лимфатические узлы с казеозными изменениями различной степени. Селезенка увеличена, плотная, с сероватыми очагами. Печень увеличена, с туберкулезными очагами. Легкие также увеличены в объеме, в них наблюдаются сероватые прозрачные очажки.

Такое же течение туберкулезного процесса наблюдают у морских свинок и при подкожном заражении их микобактериями туберкулеза человеческого вида.

Для подтверждения диагноза из пораженных лимфатических узлов делают мазки-отпечатки, которые окрашивают по Цилю-Нильсену. Если на вскрытии в органах морских свинок не обнаруживают характерных для туберкулеза изменений, материал подвергают культуральному исследованию.

Дифференциация различных видов микобактерий с помощью лабораторных животных. При дифференциации микобактерий туберкулеза бычьего и человеческого видов используют морских свинок и кроликов. Двум морским свинкам вводят подкожно в паховую область взвесь изучаемой культуры в дозе 1 мг/мл физиологического раствора. Двух кроликов заражают в краевую вену уха той же взвесью в дозе 0,1 и 0,01 мг/мл физиологического раствора. У морских свинок возбудители туберкулеза бычьего и человеческого видов обуславливают развитие тяжелого туберкулезного процесса. Большинство животных погибает через 20-90 дней после заражения. У кроликов возбудитель туберкулеза бычьего вида вызывает генерализованный туберкулез, проявляющийся наличием в легких множественных очагов, часто с появлением некроза. Нередко поражаются почки. Печень и селезенка обычно увеличены, но поражения в них встречаются в виде отдельных небольших очагов или вовсе отсутствуют. Кролики гибнут через 2-3 мес после зараже-

ния. В отличие от возбудителя туберкулеза бычьего вида, возбудитель туберкулеза человеческого вида при заражении кроликов указанной дозой не вызывает у них прогрессирующего процесса. Наблюдают лишь единичные туберкулезные очаги в легких и почках, но они могут и отсутствовать. Через 3 мес всех животных (как кроликов, так и морских свинок), оставшихся в живых, убивают. На основании их вскрытия делают заключение о видовой принадлежности изучаемой культуры микобактерий.

Для дифференциации *M. bovis* и *M. tuberculosis* от *M. avium* кроме морских свинок используют кроликов и кур. Возбудители туберкулеза бычьего и человеческого видов при заражении кур в подкрыльцевую вену в дозе 1 мг/мл физиологического раствора не вызывают заболевания. Эти виды возбудителей туберкулеза для них не патогенны. *M. avium* при подкожном заражении морских свинок в дозе 1 мг/мл вызывает у них лишь увеличение на месте заражения регионарных лимфатических узлов и быстро заживающий абсцесс в месте введения культуры. У кроликов и кур, зараженных внутривенно взвесью *M. avium* в дозе 1 и 0,01 мг/мл, развивается генерализованный септический процесс, который в большинстве случаев, начиная с третьей недели после заражения, ведет к их гибели. На вскрытии макроскопически видимые специфические для туберкулеза поражения в органах отсутствуют, однако наблюдают увеличение размеров печени и селезенки. При бактериоскопии мазков, приготовленных из органов, обнаруживают большое количество микобактерий. У кур часть штаммов *M. avium* обуславливает диссеминированный туберкулезный процесс и гибель птицы в более поздние сроки.

Лабораторные исследования на туберкулез должны быть проведены, как правило, в срок до 3 мес.

Лабораторный диагноз на туберкулез у животных считают установленным, если из исследуемого материала от млекопитающих выделена культура микобактерий туберкулеза бычьего и человеческого видов с культуральными и

биологическими свойствами, характерными для этих возбудителей болезни, или получен положительный результат биопробы на туберкулез.

Лабораторный диагноз на туберкулез у птиц считают установленным, если из исследуемого материала выделена культура микобактерий птичьего вида (от попугаев – человеческого или птичьего вида) или получен положительный результат биопробы, а также при обнаружении микобактерий в мазках из патологического материала при микроскопическом исследовании.

ЧАСТЬ 2. КУЛЬТУРАЛЬНО- МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о микобактериях, их виды и классификация

Микобактерии являются группой микроорганизмов, важной как с медицинской, так и с ветеринарной точки зрения. Их положение в систематике рода, представляющего переходную ступень между бактериями и актиномицетами, особая устойчивость к кислотам, щелочам и спиртам – факт принадлежности к патогенным видам, среди которых находятся возбудители туберкулеза людей, животных и птиц, усугубляют значение этих микроорганизмов.

По морфологическим, культуральным и биологическим свойствам возбудитель туберкулеза отнесен к порядку *Actinomycetales*, семейству *Mycobacteriaceae*, к роду *Mycobacterium* (Bergey, 1974).

Клетки микобактерий – палочковидные, прямые или слегка искривленные, иногда булабовидные. Чаще всего микобактерий не ветвятся, хотя у некоторых представителей рода формируются длинные ветвящиеся гифы или даже первичный мицелий (Красильников, 1949; Bergey, 1974; Вейсфейлер, 1975; Portaels et al., 1981). Длина микобактерий колеблется от 0,8 до 3-6 мкм, ширина – от 0,2 до 0,5 мкм. Микобактерии имеют аэробный тип дыхания, неподвижны, не образуют спор, по Граму окрашиваются положительно и часто содержат одно или несколько кислотоустойчивых зерен.

Важнейшей особенностью этих микроорганизмов является высокое содержание в их клетках разнообразных и

сложных липидов, большинство которых концентрируется в клеточной оболочке, иногда составляя 30-60% ее сухой массы (Драбкина, 1963; Коронелли, 1977, 1964; Ratledge, 1982).

По данным Портера, липиды в сухом микробном остатке составляют у *M. tuberculosis* 22,7%, *M. bovis* – 22,3, *M. avium* – 11,0, 13CG – 24,5, *M. smegmatis* – 35,6, *M. phlei* – 20,2% (цит. по: Месробяну, Пэунеску, 1963). Липиды клеточной стенки содержат миколовые кислоты, имеющие сравнительно высокую молекулярную массу с 80 атомами углерода. В 1938 г. Стодола с сотрудниками описали одну алифатическую гидроксильрованную и метаксильрованную кислоту с большой молекулярной массой и общей формулой $C_gH_{16}O_4$ – миколовую кислоту. Микобактерии синтезируют серии гомологов миколовых кислот с числом атомов С 60-90, которые при пиролизе освобождают жирные кислоты с 22-26 атомами С (Lechevalier et al., 1971). У микобактерии туберкулеза обнаружена главным образом кислота C_{26} , у атипичных – C_{24} , у сапрофитных быстрорастущих микобактерии кислота C_{26} не выявлена (Андреев, Склифас, 1977; С. Asselineau, J. Asselineau, 1978; J. Asselineau, 1981). Детальная характеристика миколовых кислот микобактерий описана в работах Т.В. Коронелли (1977, 1984), V. Levi-Frebault et al. 1983, 1986) и др.

Характерной особенностью микроорганизмов рода *Mycobacterium* является их кислотоустойчивость, т.е. способность прочно удерживать окраску фуксином или другими анилиновыми красителями при последующем воздействии растворами минеральных кислот. На этом свойстве основана дифференциальная окраска микобактерий по Цилю-Нильсену, предложенная им в 1882-1883 гг.

По современным представлениям (J. Asselineau, 1967, 1981; Goren et al., 1978), комплекс миколовая кислота – арабиногалактан – пептидогликан является основной структурой, определяющей кислотоустойчивость микобактерии. Данный комплекс (наряду с разнообразными липидами кле-

точных стенок) выполняет функцию «барьера», препятствующего проникновению в клетку кислого спирта, который вызывает обесцвечивание окрашенного соединения, образующегося при взаимодействии свободных миколовых кислот клеточных стенок микобактерий с карболовым фуксином.

С помощью петролейного эфира Н. Bloch et al. (1953) экстрагировали из вирулентных микобактерий корд-фактор, который представляет собой гликолипид–трегалозу-6,6-димиколат. Микобактерии, содержащие это вещество, образуют выявляемые при микроскопировании извилистые тяжи или косы, в которых кислотоустойчивые палочки располагаются параллельными цепочками. Формирование таких тяжей одни авторы связывают с вирулентностью (Драбкина, 1963; Dubos, Middlebrook, 1948). Другие (Halabarder, 1961) отмечают, что образование кос или тяжей – не постоянное свойство вирулентных микобактерий. Патогенные штаммы при определенных условиях могут не иметь корд-фактора и, наоборот, некоторые непатогенные штаммы способны образовывать косы. В медицинской и ветеринарной научно-методической литературе даются рекомендации по дифференциации возбудителей туберкулеза человека, крупного рогатого скота и атипичных микобактерий с использованием феномена кордообразования в комплексе с другими тестами (Солонеко, Анищенко, 1972; Колокшанская, 1974; Билько, 1988).

Нуклеиновые кислоты микобактерий изучены недостаточно, хотя они выполняют важную биологическую роль как носители генетической информации. Е.И. Квасников и др. (1978) определили, что при разрушении оболочек микобактерий путем растирания их в ступке в присутствии жидкого азота содержание ГЦ (гуанина и цитозина) в ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоте) ряда видов быстрорастущих микобактерий составляет 64,4-69,5%. Размер генома *M. bovis*, *M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. murium*, *M. scrofulaceum*, *M. vaccae*, *M. chelonae*, *M. smegmatis* составляет $1,9-3,0 \times 10^9$ д.

По данным электронной микроскопии, клетка микобактерий имеет тонкую, состоящую из трех и более слоев стенку, выполняющую защитную функцию, а также трехслойную мембрану, в которую заключена цитоплазма с находящимися в ней рибосомами и полисомами. Ядерное вещество располагается в цитоплазме в виде тонких тяжей и трубчатых образований, соединяющихся с поверхностью клетки (Ерохин и др., 1972; Билько, Матусевич, 1986; Ерохин, 1987; Левченко, 1991).

Много работ посвящено изучению ультраструктуры возбудителя туберкулеза и ее изменению под воздействием туберкулостатических препаратов и недостаточно аналогичных исследований по атипичным микобактериям (Куликовский, 1979; Асташова, 1983 и др.).

Микобактерии чаще всего размножаются простым поперечным делением. Для них характерно обособление дочерних клеток по способу раскалывания, скользящий рост концов разъединившихся клеток, отсутствие истинного и наличие кажущегося ветвления за счет соответствующего расположения обособившихся микобактерий (Нестеренко и др., 1980; Нестеренко, 1982; Georg et al., 1961).

Р. Кох, открыв в 1882 г. возбудителя туберкулеза, полагал, что он имеет единую природу, т.е. туберкулез животных, человека и птиц вызывается одним и тем же видом возбудителя.

Однако Е. Nocard, Е. Roux (1887), Rivolta (1889), А. Maffucci (1890) высказали предположение об отличии туберкулезной бактерий птичьего вида от других видов.

А.М. Максutow (1894), Т. Smith (1998) и другие авторы, подробно изучив биологические свойства и патогенность возбудителя туберкулеза, выделенного из организма человека, животных и птиц, доказали существование отдельного птичьего вида туберкулеза и подтвердили эти исследования.

Таким образом, Р. Коху и его сторонникам пришлось признать раздельное существование микобактерии человеческого, бычьего и птичьего видов.

В настоящее время различают человеческий вид (*M. tuberculosis*) – основной возбудитель заболевания человека; бычий (*M. bovis*) – возбудитель туберкулеза у крупного рогатого скота; птичий (*M. avium*) – возбудитель туберкулеза птиц; мышинный (*M. murium*), поражающий главным образом мышевидных грызунов; *M. poykilothermorum* – паразитирующий у холоднокровных (лягушки, рыбы, черепахи, змеи и т.п.).

Позднее было установлено, что наряду с истинными возбудителями от животных, человека, птиц и с объектов внешней среды изолируют так называемые атипичные, неклассифицированные, анонимные, или оппортунистические микобактерии, отличающиеся по своим свойствам от туберкулезных, кислотоустойчивых сапрофитов и друг от друга (Мартма, 1957; Драбкина, 1963; Макаревич, 1973; Колокшанская, 1974; Вейсфейлер, 1975; Frati et al. 1975; Перегудов, 1976; Лазовская, Блохина, 1976; Колычев, 1976; Полетаев, 1978; Зыков, Ильина, 1978; Козулицина и др., 1980; Домнин, 1980; Блехман и др., 1981).

Атипичные микобактерии находили и в организме спонтанно инфицированных птичьих клещей (Благодарный и др., 1971; Благодарный, 1980).

С момента открытия Р. Кохом (1882) туберкулезной палочки ее специфическая роль в этиологии туберкулеза остается неоспоримой и доказанной. Однако если в период открытия возбудителя туберкулеза Коху и его современникам казалось, что проблема этиологии туберкулеза окончательно разрешена, то уже современные исследования в этой области выявили так много новых вопросов, что день открытия возбудителя можно считать лишь днем начала его многостороннего экспериментального изучения (Каграманов, 1956). Р. Кох, будучи убежденным мономорфистом, рассматривал возбудитель туберкулеза как вид микроба с раз и навсегда зафиксированными и неизменяющимися свойствами. Однако дальнейшее изучение возбудителя показало многообразие его форм (полиморфизм) и чрезвычайно широкий диапазон изменчивости биологических свойств (плеоморфизм).

В 1888 г. И.И. Мечников обратил внимание на явление полиморфизма у микобактерий туберкулеза и отметил, что в зависимости от возраста и условий выращивания форма клеток может быть неодинаковой. Полиморфизм может проявиться в образовании зерен и кокковидных форм, впервые описанных Д.А. Гейденрейхом (1887). Дальнейшее развитие эта концепция получила в работах Л.А. Тарасевича (1899), Ю.К. Вейсфейлера (1934, 1975), А.И. Каграманова (1972), Е.С. Милько и др. (1980), Е.С. Милько (1978) и др.

Большое число исследований посвящено изучению микобактерий с измененными тинкториальными свойствами, так называемых неокислотоустойчивых, или кислотоподатливых, форм, которые возникают при нарушении внутриклеточного обмена. Исследованиями Т. Murohashi (1968) установлено, что потеря кислотоустойчивости является результатом частичной деструкции клеточной стенки, содержащей значительное количество липидов и миколовой кислоты.

Проблема видов микобактерий, несмотря на свою длительную историю, не перестает интересовать исследователей до настоящего времени. Достаточно сказать, что еще сравнительно недавно М.П. Зыковым (1969) был описан новый вид патогенных для человека микобактерий, вызывающий туберкулез у населения Африки и названный *M. africanum* (цит. по: Благодарный, 1980). В 1979 г. Казда и Мюллер выделили из мха сфагнума и описали новый вид быстрорастущих *M. komosense* (цит. по: Кадочкин, 1984).

Вопрос определения видов постоянно занимает медицинских и ветеринарных специалистов, определяющих на основании вида возбудителя эпидемиологическую и эпизоотологическую обстановку. Решение вопроса о видовой принадлежности культур микобактерий, выделенных от реагирующих на туберкулин животных, влечет за собой целый комплекс противоэпизоотических мероприятий, направленных в первую очередь на выявление источников возбудителя инфекции.

Известно, что наряду с возбудителями туберкулеза человека и крупного рогатого скота существует большая группа так называемых атипичных, потенциально-патогенных, анонимных, оппортунистических, или неклассифицированных микобактерий, которые имеют с микобактериями туберкулеза идентичные морфологические и тинкториальные свойства, но различаются по скорости роста, ферментативной активности, лекарственной чувствительности и вирулентности. Они представляют собой группу микобактерий, обладающих сенсibiliзирующей способностью и потенциальной патогенностью для человека и животных. В ослабленном организме они могут вызывать хронические заболевания, напоминающие туберкулезный процесс (Зыков, Ильина, 1978 и др.). Именно поэтому авторы считают, что из всех предложенных названий термин «потенциально-патогенные микобактерии» наиболее точно отражает их роль в патологии человека и животных.

Другой точки зрения по этому вопросу придерживается Ю.К. Вейсфейлер (1979), который считает правильным термин «атипичные микобактерии», так как этим подчеркивается их отличие от типичного возбудителя туберкулеза. В настоящее время исследователями всего мира принят этот термин. Характеристика этих микроорганизмов представлена в работах Л.И. Каграманова (1963), М.М. Дыхно (1964), Г.А. Юдина (1966, 1972), О.В. Мартма (1971, 1982), Н.М. Макаревич (1973), А.Л. Лазовской, И.Н. Блохиной (1976), М.П. Зыкова (1978), Т.Б. Ильиной (1972), А.М. Кадочкина (1979), Я.А. Благодарного (1980), С.Д. Басыбекова и др. (1985), Е.Н. Runyon (1959, 1974), L. Wayne (1971), В.П. Василева (1971), М. Tsukamura (1977, 1981, 1986, 1988), С. Collins et al. (1986), Р. Jenkins (1988), которые доказали существование разных видов микобактерий.

В 1891 г. П.Ф. Гамалея впервые описал отличительные свойства возбудителя туберкулом птиц и выдвинул гипотезу о типах возбудителя. В 1901 г. на Лондонском конгрессе по туберкулезу официально было признано три типа возбудителя этого заболевания: человеческий, бычий и птичий.

В восьмом издании определителя D. Bergey (1974) описано 30 видов рода *Mycobacterium*, но, кроме того, имеются еще и «неузаконенные» виды, не вошедшие в «Определитель» (Kubica, 1979).

С учетом морфологических, культуральных и биологических особенностей микобактерии принято разделять на 3 группы:

- 1) медленнорастущие (образующие отчетливые колонии после 7 суток выращивания;
- 2) быстрорастущие (менее чем через 7 суток);
- 3) требующие особых условий для культивирования или не культивируемые *in vitro* (Bergey, 1974). К ним относятся возбудители лепры и паратуберкулезного энтерита крупного рогатого скота.

В пределах группы медленнорастущих микобактерий выделяют виды комплекса *M. tuberculosis*, учитывая их важное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение.

Е.Н. Runyon (1974), М. Tsukamura (1981) в комплекс *M. tuberculosis* включают *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *BCG*, *M. africanum* и *M. microti*. По их мнению, вид *M. africanum* занимает промежуточное положение между *M. tuberculosis* и *M. bovis*.

В определителе D. Bergey (1974) микобактерии туберкулеза теплокровных животных и человека на основании вирулентности, культурально-морфологических и биохимических свойств разделены на четыре вида: человеческий, бычий, птичий и мышинный. Эти виды по официальной номенклатуре обозначаются: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium* и *M. microti*. Особого внимания заслуживает положение *M. avium* в современной систематике микобактерий. Если раньше возбудитель туберкулеза птиц рассматривали как один из самостоятельных видов типичных микобактерий, то в настоящее время его относят к III группе по классификации Е. Н. Runyon на основании результатов нумерического анализа, серологических исследований и изучения патогенности (Meissner, Anz, 1973; Tsukamura, 1976; Woods,

Washington, 1987). Отличие *M. avium* от других представителей III группы, в частности от *M. intracellulae*, проявляется в вирулентности для кур, но оно не является закономерным, так как среди нефотохромогенных штаммов микобактерий встречаются культуры с различной степенью патогенности.

До настоящего времени не существует единого мнения о происхождении атипичных микобактерий. Одни исследователи считают, что они произошли в результате изменчивости микобактерии туберкулеза под влиянием антибактериальных препаратов (Каграманов, 1964), хотя на находки хромогенных микобактерий в патологическом материале больных туберкулезом до эры антибиотиков некоторые авторы указывали. Другие относят их к группе микобактерий, вызывающих особые поражения у человека, отличные от туберкулеза. Некоторые ученые выдвигают оригинальную гипотезу происхождения, согласно которой эти микобактерии являются вариантами неизвестных микроорганизмов, биологические свойства которых изменились в результате внедрения фага в хромосомы бактерий, однако эта гипотеза до сих пор не подтверждена достаточным количеством фактов.

W.B. Schaefer (1967) определяет атипичные микобактерии как сапрофиты, которые попадают в организм животных и человека из внешней среды, а некоторые виды, будучи потенциально патогенными, при особых условиях могут вызывать заболевания.

На основании анализа нуклеиновых кислот, количественной таксономии и серологического изучения L.Q. Wayne (1971) показал, что типичные микобактерии являются самостоятельными видами а не мутантами *M. tuberculosis*. Считается, что атипичные микобактерии так же «стары», как микобактерии туберкулеза и лепры (цит. по: Зыков, Ильина, 1978).

Научной классификации микобактерий, основанной на их филогенетических взаимоотношениях, до сих пор не существует. Наибольшее распространение среди микро-

биологов мира получила группировка микобактерий по Е.Н. Runyon, утвержденная в 1959 г. на XV Международной конференции по туберкулезу в Стамбуле. Автор распределил микобактерии, не относящиеся к комплексу *M. tuberculosis* и к некультивируемым микроорганизмам этого рода, на основании их культуральных свойств, главным образом по пигментообразованию и скорости роста. При этом они разделены на 4 группы:

1) фотохромогенные, вырастающие в темноте непигментными, но на свету образующие колонии от лимонно-желтого до оранжевого цвета. Основной представитель этой группы получил видовое название *M. kansasii*;

2) скотохромогенные, дающие рост в темноте в виде колоний желто-оранжевого цвета, а на свету – красно-оранжевого. К этой группе относятся *M. scrofulaceum*, *M. goodii*;

3) нефотохромогенные – непигментные микобактерии, колонии которых имеют светло-кремовую окраску. Представители группы – *M. avium*, *M. intracellulare* (последний по свойствам приближается к *M. avium*, по этой причине Е.Н. Runyon включает эти виды в один комплекс);

4) быстрорастущие микобактерии, отличающиеся быстрым ростом при комнатной температуре. В данную группу входят: *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. smegmatis* и др.

Кроме группировки Е.Н. Runyon, был предложен целый ряд других классификаций, которые основывались на различных признаках микобактерий.

В 1962 г. С.Н. Collins разработал классификацию атипичных микобактерий, в которой он, так же как Е.Н. Runyon, выделил 4 группы. Однако в 1966 г. этот автор опубликовал сообщение о новой классификации, имевшей уже 10 групп микроорганизмов.

Более подробно идентифицирует атипичные микобактерии W. Kappler (1966), используя 18 культуральных и биохимических тестов. Ему удалось распределить микобактерии на 12 групп (8 известных и 4 неизвестных).

М. Buraczewska (1963) и А.И. Каграманов (1964) сделали попытку создать классификацию на основе генетического родства всех микобактерий, но до сих пор она окончательно не доработана.

Большой интерес представляет классификация, основанная на методе нумерического анализа родства микроорганизмов по признаку «similarity». Работами L.F. Boyallil et al. (1962), G.P. Kubica et al. (1973), G. Meissner et al. (1974), М. Tsukamura (1981, 1983), М. Tsukamura, S. Ichiyama (1986), показано, что микобактерии, так же как и другие микроорганизмы, можно классифицировать с использованием математического анализа. Этот метод, как наиболее объективный, находит все более широкое применение при изучении микобактерий.

Одновременно необходима единая номенклатура микобактерий, так как многие из них известны под разными названиями. Установлено, что современные данные позволяют выделить только 10 заболеваний, вызываемых различными видами микобактерий, а их возбудители известны под 25 названиями (Runyon, 1975).

Специальной подкомиссией при Международном комитете по систематизации бактерий создан проект международной номенклатуры патогенных и потенциально патогенных микобактерий, которая включает следующие виды: *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. xenopi*, *M. gastri*, а также комплексы *M. avium-intracellulareae*, *M. tuberculosis* и *M. fortuitum* (Runyon, 1974).

Таким образом, предложенные классификации не решают полностью проблему атипичных микобактерий. И хотя некоторые из них широко используются до настоящего времени, необходима дальнейшая работа по идентификации и рациональной систематизации с целью установления их видовой принадлежности.

1.2. Методы дифференциации и идентификации микобактерий

Вопрос о видовой принадлежности микобактерий, выделенных от крупного рогатого скота, имеет большое практическое и теоретическое значение, так как для успешного проведения мероприятий по профилактике и оздоровлению хозяйств от туберкулеза возникает необходимость идентификации микобактерий, в том числе атипичных.

Известно, что атипичные микобактерии по ряду признаков имеют сходство с истинными микобактериями туберкулеза (морфология, тинкториальные свойства, кислото-, спирто- и щелочеустойчивость), но вместе с тем обладают рядом свойств, близких сапрофитным микобактериям (форма колоний, скорость роста, ферментативная активность, лекарственная устойчивость).

Количество обнаруживаемых видов, подвидов, вариантов атипичных микобактерий постоянно растет. Так, по данным А.И. Кузина (1992), известно 160 видов микобактерий, по мнению Takimura и Tompson (1969), во внешней среде обитает около 200 видов микобактерий (цит. по: Зыков, Ильина, 1978). Их удастся обнаружить во всех объектах внешней среды: почве, торфе, опилках, соломе, кормах, воде рек, озер, водохранилищ, в организме клещей, рыб, птиц, диких и домашних животных, а также в различных выделениях животных и человека (Мартма, 1971, 1982; Блехман, 1972; Александров, 1973; Благодарный, 1980; Нестеренко и др., 1985; В.Н. Донченко и др. 1987; Beerwerth, Popp, 1971; Beerwerth et al., 1979 и др).

По данным Bergey (1974), в настоящее время идентифицировано только 30 видов, 11 видов микобактерий занимают неопределенное положение.

Все методики, используемые для дифференциации и идентификации микобактерий, разделяют на бактериологические, биохимические и биологические.

Бактериологические методы включают и тесты на кислото-спирто-щелочеустойчивость. Для этого делают мазки,

окрашивают их по методу Циля-Нильсена и просматривают в иммерсионной системе микроскопа; преимущество данного метода – в его быстроте. Однако возможности его ограничены. Также следует учесть, что в век антибактериальной терапии и химиопрофилактики микобактерии туберкулеза в их классической форме встречаются редко и могут выделяться в значительно меньшем количестве, поэтому этот метод оказывается недостаточно чувствительным для их выявления. В таких случаях применяют методы «накопления» или «обогащения» микобактерий. Исследования Е.Л. Скрыбиной (1955), Н.М. Колычева (1990) показали, что методы дифференциации микобактерии туберкулеза от кислотоустойчивых сапрофитов, основанные на способности последних обесцвечиваться кислотами, щелочами, спиртами, а также различными окислителями (марганцово-кислым калием, перекисью, хлорамином), ненадежны. В связи с этим микроскопия мазков не является дифференцирующим тестом патогенных и атипичных микобактерий, но она важна, так как позволяет установить чистоту и кислотоустойчивость изолированной культуры.

В последнее время широко применяют люминесцентную микроскопию. Этот метод позволяет увеличить диагностическую эффективность микроскопических исследований на 17-33% в сравнении с прямой бактериоскопией мазка (Баукин, 1963; А.С. Донченко, В.Н. Донченко, 1977; Гарвей и др. 1980), но он также не дает возможности провести надежную дифференциацию возбудителей туберкулеза от атипичных микобактерий.

Изучение культуральных свойств микобактерий на яичных и простых питательных средах позволяет установить температурный оптимум, сроки появления роста и его характер. Важным тестом дифференциации микобактерий при культивировании на питательных средах является их способность расти при разных температурных режимах. Микобактерии туберкулеза человеческого и бычьего видов растут в диапазоне 37-38° С; при более высоких и низких

температурах их рост прекращается. Культуры микобактерий птичьего вида имеют температурный оптимум 42°C, в то же время некоторые штаммы способны расти при температуре 22°C, а также при 42-45°C.

Атипичные микобактерий по отношению к температурному фактору ведут себя по-разному. Н.М. Макаревич (1973), М.П. Зыков, Т.Б. Ильина (1978) установили, что *M. kansasii* (I группа по классификации Е.Н. Runyon), а также *M. gordonae*, *M. scrofulaceum* (II группа) растут как при 37° С, так и при комнатной температуре, однако несколько медленнее. Представители III группы (*M. avium*, *M. intracellularae*, *M. xenopi*) растут при 22, 37 и 45° С. При этих температурных режимах растет и кислотоустойчивый сапрофит *M. smegmatis* (IV группа по Е.Н. Runyon), другой сапрофит *M. phlei* (IV группа) может расти даже при 52°C. В то же время *M. fortuitum*, также представитель IV группы, хорошо растет при 22° С и 37° С, однако некоторые штаммы растут и при 42°C.

Другим тестом для дифференциации микобактерий является пигментообразование. Для микобактерий туберкулеза человеческого и бычьего видов характерна светло-кремовая окраска колоний. Появление желто-оранжевого пигмента при экспозиции колоний на свету присуще микобактериям I группы по Е.Н. Runyon. Устойчивая оранжевая окраска, независимая от света, характерна для колоний *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*. Оранжевая окраска может появляться при старении культур комплекса *avium-intracellularae*. Некоторые сапрофитные микобактерий также окрашиваются в оранжевый цвет (*M. phlei*).

В качестве дифференциального теста используют способность микобактерий расти на мясопептонном бульоне или агаре. Такой способностью обладают быстрорастущие и некоторые медленно растущие микобактерии. Возбудители туберкулеза крупного рогатого скота и человека на данных средах не растут.

Используя различную потребность в кислороде ми-

кобактерий человеческого и бычьего видов, Lebeh в 1958 г. (цит. по: Благодарный, 1980) предложил применять для их дифференциации высокослойный сывороточный агар Сотона, который автор несколько видоизменил. Культуры человеческого вида растут на поверхности или в верхней части агарового столбика; микобактерии туберкулеза бычьего вида, вследствие их незначительной потребности в кислороде, образуют резко ограниченную зону роста на глубине 9-20 мм ниже поверхности среды. По данным В.Г. Ковалева (1968), этот тест имеет важное дифференциально-диагностическое значение.

Некоторое дифференциальное значение имеют форма и характер микроколоний, которые образуются при росте микобактерий в жидких питательных средах. В 1947 г. G. Middlebrook, R. Dubos, C. Pigse обнаружили, что вирулентные микобактерии отличаются от невирулентных по характеру роста микроколоний в жидкой кровяной среде, зависящему от содержания поверхностного липида (гликолипид миколовой кислоты – 6,6'-димиколаттрегалоза), который G. Middlebrook назвал корд-фактором, или фактором вирулентности. В работах Н.М. Дыхно и др. (1956), Р.О. Драбкиной (1963), А.А. Солонко, Л.К. Анищенко (1972) также подтверждена связь между выраженностью корд-фактора и вирулентностью микобактерий туберкулеза, в то же время М.Н. Немсадзе (1971), П.П. Вишневский (1973), L. Richmond, M. Cummings (1950) и др. не обнаружили корреляции между выраженностью корд-фактора и вирулентностью микобактерий туберкулеза.

По данным Н.М. Дыхно и др. (1966), Ю.К. Вейсфейлера (1975), М.П. Зыкова, Т.Б. Ильиной (1978), Т.Н. Байтеряковой, Р.Х. Зайнуллиной (1981), корд-фактор содержится и в некоторых атипичных микобактериях.

Образцы корд-фактора, выделенные из разных видов и даже штаммов микобактерий, различаются строением миколовых кислот (цит. по: Нестеренко и др., 1985). Г.А. Жусипбекова, А.К. Кривцова (1987) показали, что корд-фактор

может являться вспомогательным методом определения вирулентности, перечисленные выше морфологические и культуральные особенности микобактерий имеют лишь относительное значение для дифференциации этих микроорганизмов, а наиболее достоверные результаты при дифференциации микобактерий туберкулеза дает биологический метод. Сущность метода заключается в различной патогенности возбудителей туберкулеза в отношении лабораторных животных (Драбкина, 1963; Финкель, Михайлова, 1976). Следует отметить, что вирулентность микобактерий туберкулеза у различных штаммов в пределах вида непостоянна, она может изменяться под влиянием различных факторов (Вейсфейлер, 1975; Благодарный, 1980 и др.). Например, широко применяемые химиотерапевтические препараты и антибиотики снижают вирулентность одних штаммов микобактерий туберкулеза по отношению к морским свинкам, а другие даже делают авирулентными (Зыков, 1976; Гинзбург и др. 1986). С другой стороны, нередко встречаются штаммы микобактерий, которые по культуральным свойствам похожи на возбудитель туберкулеза, но не обладают патогенностью для лабораторных животных (Вейсфейллер, 1975; Зыков, 1976).

Я.А. Благодарный (1980) пишет, что несмотря на высокую достоверность типирования микобактерий туберкулеза на лабораторных животных эта методика не получила широкого распространения. Одной из основных причин, как указывалось выше, является снижение вирулентности микобактерий туберкулеза под влиянием химиопрепаратов, главным образом, препаратов ГИНК (гидразида изоникотиновой кислоты). Кроме того, типирование на животных обходится дорого, требует наличия специальных условий и, наконец, много времени, что значительно снижает практическое значение этих исследований.

Дифференциация микобактерий биологическим методом осложняется еще и тем, что атипичные микобактерии непатогенны для морских свинок при общепринятом методе

заражения, однако некоторые из них обладают выраженной в различной степени патогенностью для белых мышей, кроликов, кур (Юдин, 1966; Макаревич, 1973; Кадочкин, 1979; Полетаев, Погорелов, 1986 и др.). Поэтому проблема совершенствования биологического метода диагностики, особенно для выявления патогенности у атипичных микобактерий и микобактерий с ослабленной вирулентностью, остается пока нерешенной.

В связи с этим рядом исследователей предпринимаются попытки искусственно повысить чувствительность лабораторных животных к подобным микроорганизмам путем введения им иммунодепрессантов и лекарственных препаратов, понижающих резистентность организма, а также путем введения исследуемого материала нетрадиционными методами (Тюри, Сильд, 1964; Финкель, Михайлова, 1976; Поспелов и др., 1982; Грашенкова, Зыков, 1984; Брудная и др., 1987; Красота, Якушева, 1988).

Э.И. Тюри, М.Э. Тюри (1964) доказали, что хорошей моделью для определения патогенности атипичных микобактерий является заражение морских свинок в тестикулы.

Сравнивая различные методы заражения морских свинок, Н.М. Макаревич (1973) также пришла к убеждению, что наиболее чувствительным методом, позволяющим выявить скрытую патогенность, является интратестикулярный. Результативность метода повышается, если свинок предварительно сенсибилизировать лошадиной сывороткой с убитыми микобактериями.

Н.С. Столыгво (1974) считает, что подкожное заражение морских свинок взвесями изучаемых культур микобактерий в парафиновом масле позволяет определить патогенность атипичных микобактерий.

Многие исследователи придают диагностическое значение внутрикожной пробе, предложенной еще Lester в 1939 г. Сущность пробы заключается в образовании различных изменений в коже морских свинок, кроликов при внутрикожном введении культур микобактерий. Большинство

авторов (Байдакова, 1933, Клебанова, Брауде, 1964; Батуро, 1984; Красников, Харченко, 1981; Идрисова, 1984 и др.), испытывавших этот тест, считают, что он вполне пригоден для определения патогенных свойств микобактерий и их дифференциации. Преимущество пробы авторы видят в том, что она дает сравнительно быстрый ответ и очень экономична, так как на одном животном можно одновременно изучать патогенность нескольких культур. Развивающиеся при этом изменения в коже оценивают не только макроскопически, но и микроскопически, используя гистологический метод исследования.

М.М. Дыхно и др. (1963) показали, что в качестве биологической модели при диагностике туберкулеза можно использовать развивающиеся куриные эмбрионы. Микобактерии туберкулеза человеческого вида оказывают неодинаковое по тяжести патогенное действие на хорион-аллантаическую оболочку (ХАО) в сравнении с атипичными микобактериями. Микобактерии птичьего вида, фотохромогенные штаммы и кислотоустойчивые сапрофиты специфических изменений на ХАО не вызывают.

В поисках экспресс-методов дифференциации микобактерий исследователи обращаются к определению патогенности «в пробирке» (*in vitro*). С этой целью используют цитохимическую реакцию, которая основана на свойстве вирулентных микобактерий туберкулеза связывать краску нейтральрот (Middlebrook et al., 1947; Bloch, 1950). Другой цитохимический метод предложен М.М. Дыхно и др. (1957), заключающийся в непосредственной окраске нильблаусульфатом микобактерий в самом препарате.

Чтобы облегчить работу по идентификации кислотоустойчивых микроорганизмов, в последние годы применяют биохимические методы исследования, основанные на отношении микобактерий к химическим агентам и на их различной ферментативной активности.

Я.А. Благодарный (1980) считает, что биохимические методы позволяют идентифицировать микобактерии с вы-

сокой степенью достоверности, проводятся в более короткий промежуток времени и с меньшими материальными затратами.

Способность микобактерий туберкулеза человеческого вида вырабатывать больше никотиновой кислоты, чем все остальные микобактерии, положена в основу ниациновой пробы, предложенной К.Коппо. По данным К. Коппо и др. (1957), микобактерии туберкулеза человеческого вида синтезируют 4-17 мкг/мг ниацина, в то время как микобактерии туберкулеза бычьего и птичьего видов, а также сапрофиты всего лишь 0,3-0,9 мкг/мг (в перерасчете на 1 мг сухой массы бактерий). Этот тест используют для дифференциации *M. bovis* от *M. tuberculosis*, в литературе описаны различные модификации метода Коппо (Поленска и др., 1962; Э.И. Тюри, М.Э. Тюри, 1964; Kubica, 1968; Бараускене, 1974). М.П. Зыков, Т.Б. Ильина (1978) считают, что наиболее удобной является модификация, предложенная Э.И. Тюри и М.Э. Тюри. О высокой специфичности ниациновой пробы сообщают многие исследователи (Благодарный, Сидоркина, 1971; Зыков, 1976 и др.).

Учитывая способность различных видов микобактерий выделять нитратредуктазу, S. Virtanen (1963), M. Tsukamura (1976) предложили реакцию восстановления нитратов, которая позволяет дифференцировать микобактерии человеческого вида, выделяющие нитратредуктазу, от микобактерий бычьего вида и некоторых атипичных микобактерий, не способных выделять данный фермент. В. Koumare, H. David (1986) установили, что при определении нитратредуктазы наиболее достоверные и сопоставимые результаты получают при использовании метода L. Wayne, J. Dubeck, несмотря на то, что в бактериологических лабораториях чаще применяют метод, разработанный S. Virtanen. Тест нитратредуктазы можно совместить в виде комбинированной пробы с одновременным определением ниацина (Бараускене, 1972), а также с помощью бумажных полосок (Masai, 1975).

Для идентификации микобактерий широко использу-

ют амидазную пробу (Bonicke, Lisboa, 1959), включающую в себя сокращенный амидный ряд: ацетамид, мочевины, никотинамид, миразинамид, сукцинамид, аллантоин. Сущность метода заключается в том, что различные виды микобактерий, используя определенные амиды, расщепляют их с выделением аммиака, который можно улавливать реактивом Несслера и методом Русселя.

Помимо количественного метода определения амидазной активности по R. Bonicke, B. Lisboa, существует качественный бактериологический метод, предложенный A. Taguet и др. (1967).

Особое место в дифференциации микобактерий занимает никотинамидазная проба, разработанная R. Hergt et al. (1968). Авторы установили, что микобактерии туберкулеза человеческого вида обладают никотинамидазной активностью в большей степени, чем микобактерии бычьего вида. Положительную реакцию, кроме микобактерий человеческого вида, дают микобактерии туберкулеза птиц и другие атипичные микобактерии.

Авторы вышеприведенных методик и другие исследователи (Ильина, 1971; Ковалев, 1981) считают, что амидазная активность микобактерий с учетом их морфологических, культуральных и биологических свойств дает возможность определять видовую принадлежность атипичных микобактерий.

В 1961 г. S. Oka, A. Konno, H. Nagayama, продолжая исследования R. Bonicke, обнаружили у кислотоустойчивых сапрофитов фермент, катализирующий распад формамида с образованием аммиака, типичный для этих микроорганизмов. В связи с этим М.П. Зыков, Т.Б. Ильина (1978) предлагают включать в малый амидный ряд и формамид. М.М. Дыхно и др. (1964) модифицировали методику японских исследователей.

L.G. Wayne (1902) изучал активность липазы с помощью гидролиза производного олеиновой кислоты – твина-80. Путем определения липазной активности ему уда-

лось дифференцировать фото- и скотохромогенные штаммы атипичных микобактерий от микобактерий туберкулеза млекопитающих и птиц. А.Л. Лазовская, И.Н. Блохина (1970) считают, что этот тест наиболее важен для идентификации скотохромогенных и нефотохромогенных микобактерий.

В окислительно-восстановительных процессах микробной клетки активное участие принимают ферменты каталазы и пероксидазы. Важность фермента каталазы для микобактерий определяется его защитной ролью от токсического действия на бактериальные клетки перекиси водорода, которая появляется в тканях в результате клеточного обмена. Этот фермент имеется у всех видов микобактерий, кроме изониазидоустойчивых культур микобактерий туберкулеза (Рудой, 1969; Зыков, 1976 и др.). Исследования японских микробиологов показали, что каталаза у вирулентных микобактерий нестойкая и разрушается при 65-68° С, в то время как у атипичных микобактерий она термостабильная. Эти данные подтверждают результаты и других авторов (Ohshima, Okuyama, 1986). Н.М. Макаревич, Ю.П. Афанасьева (1966), изучая пероксидазно-каталазную активность у туберкулезных и атипичных микобактерий, обнаружили у последних наличие ярко выраженной каталазной и отсутствие пероксидазной активности. В последние годы для идентификации микобактерий в схемы исследований включают и арилсульфатазный тест (Wayne, 1971; Kappler, 1971 и др.). Большое значение данный тест имеет при дифференциации *M. avium* от *M. intracellulerae*, которые трудно дифференцировать другими методами (Бараускене, 1973).

Другим тестом при дифференциальной диагностике различных групп кислотоустойчивых микобактерий является исследование на лекарственную устойчивость к химиотерапевтическим препаратам. Рядом авторов установлено, что атипичные микобактерии, как правило, устойчивы к препаратам ГИНК, тогда как микобактерии туберкулеза чувствительны к ним (Юдин, 1966; Макаревич, Рудой, 1971; Вейсфейлер, 1975; Neubert, 1986). Авторы указывают на вы-

сокую естественную резистентность атипичных микобактерий и особенно представителей III группы по классификации Е.Н. Runyon.

Проблема первичной лекарственной устойчивости микобактерий становится с каждым годом все актуальнее. Имеющиеся в литературе данные в основном характеризуют культуры микобактерий, выделенные от человека. Сведений о лекарственной устойчивости микобактерий, выделенных от животных, мало. Однако в Казахстане и Западной Сибири этим вопросом занимались А.К. Кривцова, Я.А. Благодарный (1974), Б.Ф. Керимжанова, Н.М. Макаревич (1981), А.С. Донченко и др. (1987), Л.М. Каримова, Б.Я. Хайкин (1987).

В диагностических и научных лабораториях медицинского и ветеринарного профиля для дифференциации микобактерий туберкулеза бычьего и человеческого видов от остальных микобактерий широко используют способность атипичных микобактерий к росту на среде Левенштейна-Йенсена с 500-1000 мкг/мл салицилата натрия или паранитробензойной кислоты, добавленной в среду в той же концентрации (Tsukamura, 1986; Ильина, Оречкина, 1972; Ильина, 1979). Для дифференциации медленно растущих микобактерий от быстрорастущих и для дифференциации *M. iriviale* от других микобактерий III группы по Е.Н. Runyon D. Kestle et al. (1967) предложили использовать рост микобактерий туберкулеза на среде Левенштейна-Йенсена с 5%-м содержанием хлорида натрия. Метод основан на способности быстрорастущих культур IV группы, кроме *M. diernhoferi*, расти на данной среде.

Рядом исследователей доказано, что у быстрорастущих микобактерий комплекс ферментов более разнообразен, чем у микобактерий туберкулеза. О большей активности ферментных систем у этих микобактерий можно судить по исследованиям А.А. Прозорова (1956), предложившего модификации питательных сред с разнообразными смесями индикаторов, которые в результате изменения рН среды в кислую сторону меняют цвет среды.

Наряду с этими методами для дифференциации и идентификации микобактерий используют результаты изучения серологических свойств, липидного состава клеток, а также данные, полученные при изучении гибридизации ДНК-ДНК, фаготипировании, хроматографии и спектроскопии (Сапунджиева, 1972; Кадочкин, 1979; Пинчук, Лазовская, 1979; Коронелли, 1984; Девятова, 1986; Татаринов и др., 1990; Tsukamura, Mizuno, 1981; Norwood et al., 1988 и др.).

Таким образом, предложенные классификации не решают полностью проблему атипичных микобактерий. И хотя некоторые из них широко используются до настоящего времени, необходима дальнейшая работа по идентификации и рациональной систематизации с целью установления их видовой принадлежности.

Международная рабочая группа по таксономии микобактерий приступила к сравнительному испытанию принятых для дифференциации тестов с целью создания международной системы идентификации этих микроорганизмов (Tsukamura, 1981).

Несмотря на то, что в настоящее время предложено более 140 тестов, применяемых для дифференциации и идентификации микобактерий, ни один из взятых в отдельности не дает исчерпывающего ответа при изучении неизвестной культуры. Это отмечают все исследователи, занимающиеся вопросами дифференциации и идентификации. Причины такого положения усматривают в неоднородности используемых методик и в вариабельности культур микобактерий. До сих пор не выработан комплекс наиболее простых и доступных методов для практических лабораторий. Это одна из сложных и нерешенных проблем современной микробиологии. Поэтому эти методы постоянно совершенствуются и дополняются.

Позднее было установлено, что наряду с истинными возбудителями от животных, человека, из объектов внешней среды изолируют так называемые атипичные, неклассифицированные, анонимные, или оппортунистические,

микобактерии, отличающиеся по своим свойствам от туберкулезных, кислотоустойчивых сапрофитов и друг от друга (Мартма, 1982; Драбкина, 1963; Клебанова, 1964; Василев, 1971; Макаревич, 1973; Вейсфейлер, 1975; Frati et al., 1975; Перегудов, 1976; Лазовская, Блохина, 1976; Колычев, 1976; Полетаев, 1978; Зыков, Ильина, 1978; Козулицина и др., 1980; Домнин, Домнина, 1980; Блехман и др., 1981).

Атипичные микобактерии находили и в организме спонтанно инфицированных птичьих клещей (Благодарный и др., 1971; Благодарный, 1980).

Чем же продиктован интерес к атипичным микобактериям? Во-первых, они изолируются не только от людей и животных, больных туберкулезом, но и в условно-благополучных стадах, вызывая сенсibilизацию животных к туберкулинам. Дифференцировать такие реакции чрезвычайно сложно, о чем свидетельствуют работы О.В. Мартмы (1967), В.Г. Домнина (1967), А.В. Акулова, В.С. Тыриной (1969), В.А. Кузьева (1970), А.М. Говорова и др. (1970), Х.Г. Гизатуллина и др. (1972), Г.А. Юдина (1972), Л.Б. Колокшанской (1973), Н.А. Александрова (1974), К.К. Тяхнас (1974), Л.А. Ищенко (1975), А.А. Солонко, В.Д. Ковальчука (1977), А.М. Кадочкина (1979, 1984), А.С. Донченко и др. (1980), Н.П. Овдиенко и др. (1980), А.С. Донченко (1990), Н.М. Колычева и др. (1990).

Во-вторых, отдельные атипичные микобактерии могут вызывать ряд хронических заболеваний, напоминающих туберкулез, который, по мнению некоторых авторов, правильно было бы назвать «микобактериальным псевдотуберкулезом», или «микобактериозом».

Туберкулезоподобные изменения у крупного рогатого скота, свиней и птиц, вызываемые атипичными микобактериями, достаточно широко описаны в литературе (Тогунова, Хатенев, 1967; Акулов и др., 1967; Кузьев, 1972; Александров, 1973; Савченко, 1974; Тяхнас, 1974; Blacklock, Dawson, 1979; Silcox et al., 1979; Красников, Харченко, 1981).

В-третьих, атипичные микобактерии очень сложно дифференцировать от истинных микобактерий туберкулеза.

Приведенные выше данные говорят о широком распространении атипичных и сапрофитных микобактерий в природе, что обуславливает их попадание в организм животных через корм, подстилку и другие объекты внешней среды. В результате этого при лабораторной диагностике патологического материала, молока, кормов, воды, почвы, объектов среды обитания животных резко возросло число атипичных и сапрофитных микобактериальных культур, которые требуют тщательной идентификации. В этом вопросе встречается немало затруднений. Строгой классификации атипичных микобактерий до сих пор не существует. Наибольшее распространение получила рассмотренная выше классификация Е.Н. Runyon (1959), основанная на двух свойствах – образовании пигмента и скорости.

В монографиях В.Н. Василева (1971), М.П. Зыкова, Т.Б. Ильиной (1978), кроме классификации Е.Н. Runyon, приводятся классификации Бенике, Колинза, Буха и Кепплера, Каграманова и др.

Предложенные зарубежными и отечественными исследователями классификации совершенствуются и апробируются в различных лабораториях мира. Так, предлагается вести идентификацию микобактерий поэтапно:

- 1-й этап – выявление микобактерий путем микроскопии и установление их кислотоустойчивости;
- 2-й этап – идентификация важнейших патогенных видов микобактерий (*M. tuberculosis* и *M. bovis*) на основании скорости роста бактерий и биохимических тестов: чувствительность к кислоте и ниациновая проба;
- 3-й этап – идентификация прочих микобактерий на основании определения их биохимических (каталазная, пероксидазная, амидазная, липазная и В-галактозидазная активность, восстановление нитратов в нитриты) и иммунологических свойств (РА, РСК, ИФ). Наконец, экспериментальное определение патогенности микобактерий.

F. Mandler et al. (1973) описали метод быстрой идентификации атипичных микобактерий на основании скорости

роста, потребности в кислороде, пигментообразования и чувствительности к лекарственным средствам.

S. Pattyn (1975), рассматривая стратегию рутинных методов идентификации атипичных микобактерий, отмечает, что в результате деятельности Международной рабочей группы по таксономии микобактерий достигнуто соглашение между различными лабораториями в отношении классификации атипичных микобактерий и их идентификации. В связи с этим перед референс-лабораториями возникает задача разработки рациональной схемы, которая бы включала набор тестов, способных выявить свойства, «необходимые и достаточные» для идентификации атипичных микобактерий.

Как бы откликаясь на это предложение, I. Marks (1976) предлагает новую практическую классификацию микобактерий. По его мнению, на основе данных по культивированию при трех разных температурах (25, 37 и 45°C) все культуры можно разделить на пять групп: строгие мезофилы (рост только при 37°C), психрофилы (рост при 25°C, но возможен и при 37°C), мезофилы (рост при 37°C, но возможен и при 25°C), термофилы (с широким диапазоном роста от 37 до 45°C).

Эти группы, в свою очередь, подразделяют в зависимости от пигментообразования, потребности в кислороде и способности расщеплять твин. В итоге эта классификация формирует 14 подгрупп.

Таким образом, даже весьма краткий обзор современных представлений по классификации и номенклатуре патогенных и типичных микобактерий показывает, что проблема видов микобактерий до конца не решена. Даже сам автор широко распространенной в мире классификации E.H. Runyon (1974) писал, что в настоящее время нелогично пользоваться термином «атипичные микобактерии». Другой точки зрения по этому вопросу придерживается Ю.К. Вейсфейлер (1975), который считает правильным пользоваться термином «атипичные микобактерии», так как этим подчеркивается их отличие от типичного туберкулезного заболевания,

к тому же ни одно из предложенных обозначений, по его мнению, не является более научным определением.

Не вдаваясь в подробности обсуждения разногласий по терминологии атипичных микобактерий, хотелось бы заметить, что точность в определении названий различных видов микобактерий имеет серьезное методологическое значение.

Поскольку существуют разные точки зрения, следовательно, необходима дальнейшая работа по апробации методик и их практической оценке.

Какие же методы идентификации микобактерий используются в настоящее время? В практике работы лаборатории в зависимости от уровня специализации используют бактериологические, биохимические, серологические методы идентификации, фаготипирование и некоторые дополнительные тесты.

Бактериологические методы идентификации микобактерий включают в себя тесты на кислото- и спиртоустойчивость. С этой целью готовят мазки, окрашивают по методу Циля-Нильсена и просматривают под микроскопом с иммерсионной системой. Считается, что микобактерии туберкулеза представляют собой тонкие, прямые или изогнутые величиной от 1 до 5 мкм, нередко зернистые, рубиново-красные палочки, располагающиеся поодиночке, группами или небольшими скоплениями. Однако в век антибактериальной терапии и химиопрофилактики микобактерии туберкулеза в их классической форме встречаются очень редко, поэтому к морфологическому признаку мы должны относиться с большой осторожностью. Методы дифференциации микобактерий туберкулеза от кислотоустойчивых сапрофитов, основанные на способности последних обесцвечиваться кислотами, спиртами, щелочами, антиформинном, а также различными окислителями – марганцово-кислым калием, перекисью водорода, хлорамином и другими (Скрябина, 1955; Говоров 1970 и др.), как мы уже указывали ранее, не являются надежными. Поэтому микроскопия маз-

ков не может быть признана дифференциальным тестом для патогенных, атипичных и кислотоустойчивых сапрофитов, но она важна, так как позволяет установить чистоту и кислото-спиртоустойчивость изолированной культуры.

Изучение культуральных свойств на яичных и простых средах дает возможность установить сроки появления и морфологические особенности колоний. Вирулентные культуры микобактерий бычьего вида на питательных средах растут очень медленно (в течение 21-30 и более дней) в виде гладких сферических или шероховатых колоний, сухих крошек.

Культуры микобактерии человеческого вида также растут в виде сферических колоний, которые встречаются как в R-, так и в S формах.

Свежевыделенные штаммы микобактерий птичьего вида растут быстрее человеческого и бычьего видов. Рост характеризуется гладкими, мелкими, круглыми, светло-желтыми, блестящими, с ровными краями колониями, располагающимися как одиночно, так и скоплениями или в виде сплошного слизистого налета.

Колонии атипичных и сапрофитных микобактерий могут быть сухими или влажными, морщинистыми или гладкими, полушаровидными, серовато-белыми, желтыми, оранжевыми, красными и других оттенков, в зависимости от их вида.

Важным тестом дифференциации микобактерии при культивировании на плотных и жидких питательных средах является их способность расти при различных температурных режимах. Для *M. tuberculosis* оптимум температуры 37-38°C. При температуре 18-20 и 45°C они не растут. Для *M. bovis* оптимум температуры 38-39°C. Они не растут при комнатной температуре и при повышенных температурах (45°C). *M. avium* имеют температурный оптимум 42°C, в то же время растут при температуре 18-22°C, а также при повышении температуры до 45°C. Рост культур появляется в более короткое время (5-10 дней) по сравнению с микобактериями человеческого и бычьего видов.

Атипичные и кислотоустойчивые сапрофиты по отношению к температурному фактору ведут себя по-разному. Т.Б. Ильина (1877) установила, что рост при 22, 37 и 45°C дают *M. avium*, *M. intracellulareae*, *M. xenopi*, при 22 и 37°C – *M. marinum* (фотохромогенный штамм). При этой же температуре растет сапрофит *M. fortuitum*. Рост при 22, 35 и 45°C характерен для *M. smegmatis* (колонии окрашены). При 22, 37, 45 и 52°C растет *M. phlei* (колонии окрашены).

Демонстрационным тестом для дифференциации кислотоустойчивых микобактерий всех групп (патогенные, атипичные и сапрофитные) является способность их к пигментообразованию. Для микобактерий туберкулеза как человеческого, так и бычьего вида характерна светло-кремовая окраска. Появление желто-оранжевого пигмента при экспозиции колоний на свету характерно для микобактерий II группы по классификации Е.Н. Runyon.

Устойчивая оранжевая окраска, не зависящая от света, характерна для колоний *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*. При старении культур оранжевая окраска появляется у *M. intracellulareae*. Сапрофитные микобактерии также могут окрашиваться в оранжевый цвет. Пигментообразование определяют в период интенсивного роста и развития микобактерий. При длительном хранении появление пигмента возможно даже у нефотохромогенных культур (Тузова, 1963, 1975; Одаренко, 1964; Юдин, 1972; Зыков, Ильина, 1978; Козулицина и др., 1980).

При изучении культуральных свойств различных микобактерий в качестве дифференциального теста используют их способность расти на мясопептонном агаре. Такой способностью обладают быстрорастущие и скотохромогенные микобактерии. Микобактерии человеческого и бычьего видов на мясопептонном агаре не растут.

Некоторое дифференциально-диагностическое значение имеет форма микроколоний, которые образуются при росте микобактерий в жидких питательных средах. Микобактерии туберкулеза человеческого и бычьего вида образу-

ют микрокультуры в виде кос, жгутов, завитков, скоплений, имеющих ориентированный рост. Это явление, так называемый корд-фактор, подметили R. Dubos, G. Middlebrook (1948). Связано оно с целостностью липидных структур, расположенных на поверхности клетки и присущих только вирулентным микобактериям (Дыхно и др., 1956; Драбкина, 1963; Полякова, 1969; Солонко, Анищенко, 1972; Кондюрин, Колычев, 1976; Зыков, Ильина, 1978 и др.). Атипичные и сапрофитные микобактерии, за исключением *M. kansasii* и *M. chelonae*, не склонны образовывать строго ориентированные микроколонии.

Перечисленные выше морфологические и культуральные особенности микобактерий на современном этапе могут иметь лишь относительное значение. Наиболее четкие результаты при дифференциации вирулентных культур микобактерии дает биологический метод.

Сущность биологического метода дифференциации вирулентных микобактерий туберкулеза основана на различной их патогенности в отношении кроликов и морских свинок (Бронштейн и др., 1934; Соколова, 1939; Аликаева, Жерносек, 1950; Благодарный, 1980).

Некоторые исследователи указывают, что, используя биологический метод, необходимо учитывать случаи, когда не все штаммы одного и того же вида обладают одинаковой вирулентностью. Например, слабовирулентные штаммы не вызывают специфических изменений в организме животного, а высоковирулентные штаммы бычьего вида могут вызывать у кроликов быстротечную септическую форму заболевания, симулируя таким образом признаки болезни, характерные для возбудителя туберкулеза птичьего вида. Кроме того, животные одного вида неодинаково чувствительны к одним и тем же микобактериям. Во избежание неправильной интерпретации результатов исследования авторы рекомендуют для опытов брать несколько животных разных видов.

С другой стороны, нередко встречаются штаммы ми-

кобактерий (Юдин, 1972; Каграманов, Макаревич, 1977; Аликаева, Якушева, 1978), которые по культуральным свойствам похожи на возбудителя туберкулеза, но не обладают патогенностью для лабораторных животных.

Я.А. Благодарный в 1980 г. писал, что несмотря на высокую достоверность типирования микобактерий туберкулеза на лабораторных животных эта методика не получила широкого распространения. Одной из основных причин является снижение вирулентности микобактерий туберкулеза для лабораторных животных под действием химиопрепаратов, главным образом, препаратов ГИНК. Кроме того, типирование на животных обходится дорого, требует наличия специальных условий и, наконец, много времени, что значительно снижает практическое значение этих исследований.

Чтобы облегчить работу по идентификации кислотоустойчивых микобактерий, в последние годы стали применять биохимические методы исследования, основанные на том, что в процессе метаболизма разные виды микобактерий проявляют различную ферментативную активность. При идентификации микобактерий человеческого вида наиболее популярен ниациновый тест. Суть его заключается в том, что микобактерии туберкулеза человеческого вида в процессе своей жизнедеятельности способны вырабатывать больше никотиновой кислоты (ниацина), чем возбудитель бычьего вида и все остальные микобактерии. Эта проба была предложена К. Konno (1956).

По данным К. Konno et al. (1957), микобактерии человеческого вида содержат от 4 до 17 мкг/мг, бычьего – 0,9, птичьего – до 0,7 мкг/мг ниацина. Соответственно атипичные и сапрофитные микобактерии имеют от 0,2 до 0,9 мкг/мг ниацина на 1 мг сухой микобактериальной массы.

А. Krebs, W. Kappler (1964), А.Я. Благодарный, Э.В. Сидоркина (1971) считают, что ниациновый тест с большой достоверностью позволяет дифференцировать микобактерии человеческого вида в сравнении с биопробой на лабораторных животных. Биологический метод, по их мнению, более трудоемок, длителен и не всегда дает четкие результаты.

Для определения ниацина в литературе описаны различные модификации теста К. Konno (Medveczky, 1960; I. Lohaj, 1963; Поленска и др., 1962; И.Э. Тюри, М.Э. Тюри, 1964; Бараускене, 1972, 1974).

Учитывая способность различных видов микобактерий выделять нитраредуктазу, S. Virtanen (1960) предложил реакцию восстановления нитратов, которая позволяет дифференцировать микобактерии человеческого вида (они выделяют нитраредуктазу) от микобактерий бычьего, птичьего видов и некоторых атипичных микобактерий, неспособных выделять нитраредуктазу.

В диагностических лабораториях как медицинского, так и ветеринарного профиля для идентификации микобактерий широко используют амидазную пробу R. Bonicke (1959), включающую в себя сокращенный амидный ряд: ацетамид, мочеви́ну, никотинамид, пиразинамид, сукцинамид и аллантаин. Сущность метода заключается в том, что различные виды микобактерий, используя определенные амиды, расщепляют их с выделением аммиака, который можно улавливать методом Русселя, реактивом Несслера и др. Имеются два метода определения амидазной активности микобактерий: количественный биохимический метод и качественный биохимический метод (Bonicke, Lisboa, 1959). М.Н. Зыков, Т.Б. Ильина (1978) считают полезным включать в малый амидный ряд также формамид, который ферментирует быстрорастущие микобактерии (*M. fortuitum*, *M. smegmatis* и *M. phlei*). Формамидазную активность определяют по методу М.М. Дыхно и др. (1964). Следует указать, что одни исследователи (Должанский, 1964; Василев, 1971; Юдин, 1972, 1976) считают, что формамидаза содержится только у кислотоустойчивых сапрофитов, другие (Дыхно и др. 1964; Зыков, Ильина, 1978) полагают, что формамидазной активностью обладают и некоторые представители атипичных микобактерий. С точки зрения наших данных (Колычев, 1990), не все кислотоустойчивые сапрофиты содержат формамидазу. Этот вопрос нуждается в дополнительном изучении.

Список и характеристику биохимических методов идентификации кислотоустойчивых микобактерий можно было бы продолжить, однако рамки монографии не позволяют нам этого сделать. Поэтому мы лишь перечислим те из них, которые наиболее часто используются в лабораторной практике. К таковым иным можно отнести определение каталазной и арилсульфатазной активности, рост на среде с салицилатом натрия, деградацию (разрушение) натрия салицилата, ПАСК, использование нитрата как единственного источника азота, устойчивость к 5%-м хлориду натрия, к пикриновой кислоте, сахаролитическую активность, гидролиз твина-80 и др. Указанные тесты апробированы многочисленными авторами (Wayne, 1962; Макаревич, Афанасьева, 1968; Ильина, Оречкина, 1972; Pavlas, 1973; Сидоркина, 1973; Бараускене, 1973; Михайлова, 1973; Дыхно и др., 1975; Wayne et. al., 1976; Зыков, 1976; Ильина, Молдавер, 1979; Керимжанова, 1980).

Подводя итог вышеизложенному, можно сказать, что лабораторная диагностика туберкулеза, основанная на микроскопии, выделении чистой культуры, идентификации ее по культурально-биохимическим и патогенным свойствам, сделала значительный шаг вперед, однако все еще считается трудоемкой и не всегда эффективной. Поэтому исследователи продолжают работу по поиску новых, более перспективных методов обнаружения и идентификации кислотоустойчивых микобактерий.

В последние годы с целью диагностики туберкулеза животных и человека, а также идентификации кислотоустойчивых микобактерий широко апробируются серологические методы, основанные на иммунологических реакциях.

W. Schafer (1967) показал, что *M. avium*, *M. kansasii* и *M. chelonae* могут быть идентифицированы в реакции агглютинации с помощью специфических антисывороток, полученных обычным способом. Методику Шефера с положительными результатами испытывали Н. Saito (1968), А.М. Кадочкин (1979), Т.Н. Козулицина и др. (1980).

В дальнейшем упростили методику Шефера и предложили использовать метод агглютинации на предметных стеклах. Эта реакция с успехом была использована Э.А. Шарифуллиным (1981) в качестве экспресс-метода для дифференциации микобактерий третьей группы по Е.Н. Runyon.

Достаточно широкую известность получил метод флюоресцирующих антител (МФА), который используется для обнаружения антител в сыворотке крови животных, больных туберкулезом, и идентификации микобактерий в препаратах их чистых культур (Кноринг, 1970; Кузьмин и др., 1971; Нелюбин, 1972).

Авторы считают, что метод флюоресцирующих антител может быть использован для идентификации микобактерий в культурах и их антигенов в исследуемых тканях. Однако применение флюоресцирующих антител для изучения микобактерий на данном этапе развития науки еще не получило широкого применения, главным образом из-за того, что очень трудно получать высокоиммунные сыворотки. Кроме того, в опытах выявлена серологическая общность между истинными микобактериями туберкулеза и атипичными, а также сапрофитными микобактериями, что накладывает отпечаток на получение стабильных результатов.

Наиболее широкое применение для идентификации микобактерий получили методы диффузионной преципитации в агаре. Об этом свидетельствуют работы В.М. Должанского (1964), Б.Н. Козьмина-Соколова (1966), R. Rees (1971), М.П. Зыкова, Т.Б. Ильиной (1978) и др.

Существуют и другие методы для определения вида микобактерий: фаготипирование (Кособуцкий, 1971; Зыков, 1976; Redmond et al., 1979); иммуноэлектрофорез (Mitze, 1978); микроколориметрия, радиометрия, кожные реакции с сенситинами (Magnusson, 1969; Зыков, Ильина, 1978 и др.); газовая хроматография (Пинчук, Лазовская, 1981; Рачкова и др., 1991; Воробьев, Куликовский, 1991; Бибергалов, 1991); лазерная спектроскопия (Околелов и др., 1991) и др.

Итак, заключая весьма краткий, но вполне достаточ-

ный для понимания вопроса обзор литературы по классификации и методам идентификации микобактерий, следует указать, что ни одна из известных классификаций микобактерий, равно как и ни один из предложенных методов их идентификации, не дают стопроцентного ответа о виде микобактерий. К сожалению, далеко не все тесты могут быть использованы в практических лабораториях. Даже в специализированных лабораториях результаты коллективного изучения закодированных культур были неоднозначными. Следовательно, необходима дальнейшая апробация, совершенствование и обработка наиболее простых и легковыполнимых тестов в бактериологических лабораториях или практических учреждениях.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Были изучены морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические и патогенные свойства культур микобактерий, изолированных из организма животных и объектов внешней среды животноводческих ферм, благополучных и неблагополучных по туберкулезу.

2.1. Материалы и методы исследования

Объектами исследования были 1133 пробы диагностического материала, в том числе 244 пробы (кусочки внутренних органов и лимфатических узлов) от крупного рогатого скота, реагирующего на туберкулин для млекопитающих, 769 проб от лабораторных животных и телят, экспериментально зараженных возбудителем туберкулеза бычьего вида и атипичными микобактериями, а также 120 проб молока и проб-смыслов с молочного оборудования.

Лабораторные исследования проводили согласно «Методическим указаниям по диагностике туберкулеза животных» (1976), «Наставлению по диагностике туберкулеза животных» (1986) и ГОСТ 26072-84 «Животные и птица сельскохозяйственные» (1984).

Дифференциацию и идентификацию микобактериальных культур проводили в соответствии с методическими рекомендациями «Бактериологическая и биохимическая идентификация микобактерий» (Ильина, 1975, 1980). У выделенных культур изучали:

- скорость роста субкультур на среде Левенштейна-Йенсена при температуре 22, 37, 45 и 52°C;

- характер роста на среде Левенштейна-Йенсена и мясопептонном бульоне при 37°C;

- характер микророста микобактерий по методу Прайса (1941) с использованием среды Сотона;

- характер колоний: величину, форму, поверхность, консистенцию и т.д.;

- тинкториальные свойства (окраска по Циллю-Нильсену, Граму, Мурохаши);

- способность к пигментообразованию на свету и в темноте по методу Kubica (1973);

- рост на среде Левенштейна-Йенсена с содержанием в 1 мл среды 0,5 и 1,0 мг салицилата натрия по методу Tsukamura (1962);

- рост на среде Левенштейна-Йенсена с содержанием в 1 мл среды 2,0 мг парааминосалицилата натрия по методу Tsukamura (1962);

- толерантность к 5%-му хлориду натрия по методу Kestle et al. (1967);

- реакцию гидролиза твина-80 по методу Wayne (1962);

- ниациновый тест по методу Konno (1957) в модификации Э.В. Сидоркиной, А.С. Бейсенбекова (1981);

- редукцию нитратов по методу Tsukamura et al. (1966);

- амидазную активность по методу Taguet et al. (1967) в модификации Т.Б. Ильиной (1978);

- формамидазную активность по методу Nagayama et al. (1961) в модификации М.М. Дыхно (1964);

- арилсульфатазную активность по методу Tarshis (1964), Wayne et al. (1967);

- каталазную активность по методу Wayne (1962);

– деградацию салицилата и парааминосалицилата натрия по методу Tsukamura (1966);

– лекарственную чувствительность к препаратам I ряда: стрептомицину, изониазиду, ПАСК определяли непрямым методом, выращивая культуры микобактерий на среде Левенштейна-Йенсена (без крахмала), содержащей различные концентрации препаратов.

Для отличия микобактерий туберкулеза от кислотоустойчивых сапрофитов при бактериоскопическом исследовании применили методику Л.Е. Скрыбиной (1955).

Для определения видовой принадлежности микобактерий туберкулеза и степени их патогенности заражали лабораторных животных по общепринятым методикам. Павших и убитых по истечении 3 мес после заражения животных вскрывали, учитывали наличие и характер туберкулезных изменений во внутренних органах и лимфатических узлах по методике А.И. Тогуновой. Посев патологического материала проводили на среды Левенштейна-Йенсена по методу Гона-Левенштейна-Сумиоши.

При изучении культурально-морфологических, тинкториальных, биохимических свойств и лекарственной чувствительности у эпизоотических культур микобактерий, а также культур, полученных в экспериментах, в качестве контроля использовали референтные культуры микобактерий, любезно предоставленные нам Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Тарасевича, Центральным научно-исследовательским институтом туберкулеза и Всесоюзным научно-исследовательским институтом ветеринарной санитарии (*M. bovis* шт. 8., *M. avium* шт. «Берлин», *M. avium* шт. 19, *M. intracellulareae*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. fortuitum*, *M. diernhoferi*, *M. B-5*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. flavescens*, *M. vaccae*).

Сравнительное изучение разных методов введения суспензий исследуемых культур лабораторным животным для

дифференциации микобактерий проводили на 99 морских свинок, 27 кроликах и 30 куриных эмбрионах, используя методики, предложенные Honi (1925), Kite и Patnode (1952), Todao-Todda, Fodor-Ferenczi. Объектом исследования служили 27 штаммов музейных и производственных культур микобактерий.

В первом опыте при сравнительном изучении интратестикулярного и подкожного методов заражения использовали 36 морских свинок массой тела 300-350 г, которых разделили на 12 групп по 3 в каждой. Заражение проводили культурой *M. bovis* (шт. 8, 14, 92, 94).

Животных 1, 2, 3 и 4-й групп заразили подкожно во внутреннюю поверхность бедра в дозе 1 мг бактериальной массы в 1 мл физиологического раствора. Морских свинок 5, 6, 7 и 8-й групп заразили интратестикулярно в дозе 1 мг бактериальной массы в 0,4 мл физиологического раствора. Животные 11-й и 12-й групп были контрольными (интактными). Во всех опытах степень патогенности изучаемых культур оценивали по срокам гибели зараженных животных, по снижению массы тела и по интенсивности поражения внутренних органов. В первом опыте макроскопические изменения внутренних органов и лимфатических узлов оценивали по схеме А.И. Тогуновой, согласно которой максимальная пораженность равна 30-31. При индексе пораженности меньше 15 туберкулезный процесс рассматривали как маловыраженный, а культуру – как слабовирулентную; индекс пораженности, равный 15-18, соответствовал туберкулезу средней тяжести и средней вирулентности культуры, а индекс 24-31 – тяжелому развитию туберкулеза и высокой вирулентности культуры. Использование числовых показателей (индексов) при оценке патолого-анатомических изменений позволило применить математический метод для проверки достоверности результатов опытов.

Во втором опыте, поставленном для выявления патогенности атипичных микобактерий, 45 морских свинок разделили на 9 групп по 5 в каждой. Животным 1, 2, 3 и 4-й

групп микобактериальные суспензии (*M. avium*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei*) вводили под кожу в дозе 1 мг бактериальной массы в 1 мл физиологического раствора; животным 5, 6, 7, 8-й групп вводили те же культуры и в той же последовательности в тестикулы в дозе 1 мг бактериальной массы в 0,4 мл физиологического раствора; животные 9-й группы были контрольными (интактными).

В этом опыте для оценки характера патолого-анатомических изменений у свинок использовали другой цифровой показатель – селезеночный индекс (СИ), так как индекс пораженности по Тогуновой применяют при наличии выраженных макроскопических изменений туберкулезного характера, которые, как правило, не развиваются у лабораторных животных, инфицированных атипичными микобактериями.

Объектами исследования служили культуры микобактерий, выделенные нами от крупного рогатого скота, реагировавшего на туберкулин, и дифференцированные как *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* и *M. phlei*. Исследуемые культуры по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам имели идентичные показатели с референтными штаммами этих же видов.

Клинические наблюдения за морскими свинками вели в течение 3 мес. При патолого-анатомическом вскрытии животных через 30 и 90 дней отбирали материал для бактериологического и гистологического исследований.

Для выяснения достоверности внутрикожного метода заражения при дифференциации микобактерий туберкулеза от атипичных мы провели три эксперимента на 18 морских свинках и 27 кроликах массой не менее 3000 г. В опытах на аналогичных по возрасту и массе тела здоровых животных было изучено 27 культур микобактерий, из них музейных: *M. bovis* шт. 8, *M. avium* шт. «Берлин», 19, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. vaccae*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. diernhoferi*; производственных: *M. bovis* шт. 14, 92, 94, 99, 100, *M. avium* шт. 163, *M. gastris* шт. 63, *M. terrae* шт. 66, *M. gordonae* шт.

125, *M. fortuitum* шт. 19, 70, 127, *M. smegmatis* шт. 129, 130, *M. phlei* шт. 126, *M. flavescens* шт. 2, 81, *M. diernhoferi* шт. 64.

Культуру каждого из перечисленных штаммов вводили трем морским свинкам и трем кроликам в дозе 0,1 мг полувлажной бактериальной массы, суспендированной в 0,1 мл физиологического раствора. Морским свинкам суспензии вводили в четыре изолированные точки живота, 18 кроликам – в область наружного края уха, так чтобы площадь для одной пробы была не менее 2 см, а 9 кроликам суспензии микобактерий инъецировали в кожу после ее депиляции на внутренней стороне локтевого и коленного суставов в той же дозе. Реакцию в месте введения культуры учитывали через 48, 72 ч и в последующем через каждые трое суток до гибели животных. При этом определяли средние размеры (диаметр) воспалительной реакции по группе, время появления некрозов и язв, наличие вторичных воспалительных изменений, начало и окончание заживления с эпителизацией кожного дефекта.

В четвертом опыте в качестве экспериментальной модели для дифференциации атипичных микобактерий от возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота использовали 6-9-дневную хорион-аллантаисную оболочку развивающегося куриного эмбриона, при этом провели сравнительное изучение макроскопических и гистологических изменений хорион-аллантаисной оболочки куриных эмбрионов при заражении различными культурами микобактерий: *M. bovis* шт. 14, *M. avium* шт. «Берлин», *M. phlei*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*. Каждой культурой заражали по пять эмбрионов. Заражение проводили суспензией, приготовленной из расчета 0,1 мг культуры в 0,2 мл физиологического раствора, которую наносили шприцем на поверхность через отверстие в скорлупе в области воздушного мешка. В качестве контроля пяти эмбрионам на поверхность ХАО наносили 0,2 мл стерильного физиологического раствора. Все эмбрионы выдерживали в термостате в течение 8-10 сут при 38°C. После инкубации их вскрывали и изучали состояние

ХАО. Участок оболочки вырезали и фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, далее фиксированную оболочку заливали в парафин. Срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Одновременно при взятии материала для гистологического исследования отбирали материал для бактериологического исследования.

Следующим этапом работы было изучение достоверности шести культурально-биохимических тестов, рекомендованных М. Tsukamura et al. (1962, 1966), D. Kestle et al. (1967) и А.А. Прозоровым (1956) для дифференциации микобактерий:

- 1) определение чувствительности микобактерий к 0,05 и 0,1%-му салицилату натрия;
- 2) определение чувствительности к 0,2%-му ПАСК;
- 3) определение устойчивости микобактерий к 5%-му хлориду натрия;
- 4) тест деградации салицилата натрия;
- 5) тест деградации ПАСК;
- 6) определение чувствительности микобактерий к кислотно-основным индикаторам (малахитовая зелень и нейтральрот), добавляемым в питательные среды Петраньяни и Левенштейна-Йенсена. При изучении указанных тестов использовали 69 штаммов референтных и производственных культур микобактерий, суспензии которых высевали в 4968 пробирок со средами.

Приготовление сред с добавлением различных препаратов и методики проведения опыта изложены Т.Б. Ильиной в методических рекомендациях «Бактериологическая и биохимическая идентификация микобактерий» (1980) и А.А. Прозоровым (1956).

Приготовление взвесей микобактерий в экспериментах по изучению выживаемости и влиянию физических факторов на возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота и атипичные микобактерии, находящиеся в воде, физиологическом растворе и молоке, осуществляли из расчета 1,5 млн микробных тел в 1 мл исследуемого материала.

Объектами исследования служили 13 культур микобактерий, выращенных на среде Левенштейна-Йенсена, из них: 3-недельные культуры *M. bovis* (шт. 8, 14, 92), 2-недельные культуры *M. avium* (шт. 163, «Берлин»), *M. intracellulareae*, *M. xenopi*, *M. gordonae* и 5-дневные культуры производственных штаммов 4, 19, 64, 128, идентифицированные как *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. phlei*. Эти культуры были выделены от животных, реагирующих на туберкулин, но без специфических поражений, характерных для туберкулеза. Культуры микобактерий туберкулеза бычьего вида (шт. 14, 92) получены от крупного рогатого скота с туберкулезными изменениями в заглочных и подчелюстных лимфатических узлах. Остальные культуры – музейные.

Изучение патогенных и сенсibiliзирующих свойств атипичных микобактерий, наиболее часто выделяемых от крупного рогатого скота, проводили на 27 клинически здоровых телятах 4-месячного возраста, не реагирующих на туберкулин для млекопитающих и КАМ, со средней массой тела 92 кг.

Животных разделили на 8 опытных и одну контрольную группы, по 3 головы в каждой. Для заражения телят использовали 5-дневные культуры *M. fortuitum* шт. 19, *M. smegmatis* шт. 129, *M. phlei* шт. 128, 2-недельную культуру *M. avium* шт. 163, выращенные на среде Левенштейна-Йенсена, а также эти же штаммы микобактерий, изолированные в лабораторных условиях с тест-объектов после их дезинфекции 3%-м щелочным раствором формальдегида. Телят 1, 2, 3 и 4-й групп заражали *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. avium*, телят 5, 6, 7 и 8-й групп – культурами этих же микобактерий, подвергавшихся воздействию дезинфектанта. Культуры суспендировали в 10 мл физиологического раствора и вводили однократно интратрахеально в дозе 2 мг на 1 кг массы тела животного с предварительным введением в трахею 5 мл 5%-го раствора новокаина. Телятам 9-й группы (контрольной) вводили стерильный физиологический раствор в объеме 10 мл. Телят содержали в изолированных боксах.

Динамику аллергической реактивности телят проверяли симультанной пробой через каждые 30-45 дней в течение 226 дней (срок наблюдения) согласно «Наставлению по диагностике туберкулеза животных» (1986). Павших и убитых животных подвергали тщательному патолого-анатомическому исследованию. Отобранный на вскрытии материал исследовали бактериологическим и гистологическим методами. Гистологические исследования выполнены старшим научным сотрудником лаборатории патологической морфологии ВНИИБТЖ, кандидатом биологических наук К.Г. Щелкановым.

Субмикроскопическую организацию атипичных микобактерий изучали по методике А. Ryter, E. Kellenberger (1958) совместно с научными сотрудниками лаборатории химико-физических методов исследования ВНИИБТЖ Б.И. Коганом и Л.В. Гежес. В работе использовали 5 культур микобактерий: *M. xenopi*, *M. intracellularae*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis* и производственный штамм № 12, идентифицированный нами как *M. phlei*. Из культур, выросших на среде Левенштейна-Йенсена, готовили суспензии, которые стандартизировали по бактериальному стандарту мутности – 500 млн микробных тел в 1 мл среды, а затем разводили физиологическим раствором 1:10. В яичную среду Левенштейна-Йенсена, не содержащую крахмала (так как он адсорбирует лекарственные препараты), до свертывания добавляли изониазид в концентрациях 0,1; 1,0; 5,0; 10,0 мкг/мл среды. Питательную среду с различными концентрациями препарата разливали в пробирки по 5 мл и свертывали в наклонном положении в течение 15 мин при температуре 85°C, не допуская ее перегревания. В качестве контроля использовали рост культур на среде без добавления изониазида. Суспензии, приготовленные из каждого штамма микобактерий, в объеме 0,2 мл высевали на 15 пробирок (по 3 на каждое разведение препарата и контрольных). Пробирки с посевами помещали в термостат при температуре 37°C. Для оценки

интенсивности и скорости роста исследуемых культур посе-
вы просматривали ежедневно. Оценку и учет выросших ко-
лоний проводили по 4-балльной системе (по Г.Н. Першину).

Для электронной микроскопии материал (колонии)
фиксировали раствором глутарового альдегида и осмия,
обезвоживали в спирте возрастающей концентрации (от 30
до 100%) и после проведения колоний через промежуточ-
ные смеси смол заливали их в аралдит. Залитый материал
подвергали полимеризации в разных температурных режи-
мах. Ультратонкие срезы с полученных блоков готовили на
ультратоме УМТП-5 и после двойного контрастирования по
Рейнольдсу проводили изучение ультраструктуры микобак-
терий в электронном микроскопе ЭВМ-100Б при ускоряю-
щем напряжении 75-100 кВ.

2.2. Выделение культур микобактерий от крупного рогатого скота, реагирующего на туберкулин, в хозяйствах с различной эпизоотической ситуацией по туберкулезу

Для определения видового состава микобактерий, цир-
кулирующих среди крупного рогатого скота, реагирующего
на туберкулин для млекопитающих, нами исследовано 244
пробы секционного материала (лимфатические узлы, кусоч-
ки паренхиматозных органов), 60 проб молока, полученных
от животных шести сельскохозяйственных предприятий Но-
восибирской области с различной эпизоотической ситуаци-
ей по туберкулезу, а также 60 проб-смывов с молочного обо-
рудования. Материал для исследования был отобран на мя-
сокомбинатах при ветеринарно-санитарной экспертизе туш.

На шести сельскохозяйственных предприятиях, где не-
благополучие по туберкулезу подтверждено патолого-анато-
мическими и бактериологическими исследованиями, от 164
животных, реагировавших на туберкулин, выделено 48, или
29,3%, культур, из которых 9, или 5,6%, отнесены к микобак-
териям туберкулеза бычьего вида и 39 (23,7%) культур – к
атипичным микобактериям II, III, IV групп по классифика-

ции Е.Н. Runyon (табл. 1). При бактериологическом исследовании проб молока и смывов с молочного оборудования получено 6, или 7,5%, культур атипичных микобактерий, дифференцированных как *M. gordonae*, *M. avium*, *M. vaccae*, *M. phlei*, *M. diernhoferi* (проценты указаны от количества исследованных проб).

Таблица 1

Результаты бактериологических исследований послеубойного материала от крупного рогатого скота из хозяйств с различной эпизоотической ситуацией по туберкулезу

| Результаты исследований | Сельскохозяйственные предприятия | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|------------------|--------|-----------------------|----------------|---------------|
| | неблагополучные | | | | благополучные | |
| | Маяк | Отре- ченский | Родина | Знамя ком- мунизма | Таган- ский | им. Кирова |
| Биопробы, всего | 44 | 44 | 36 | 40 | 40 | 40 |
| В т.ч. с туберкулезными изменениями | 2 | 2 | 2 | 2 | - | - |
| Выделено культур микобактерий, всего | 14 | 12 | 14 | 8 | 8 | 11 |
| В т.ч. бычьего вида | 3 | 2 | 2 | 2 | - | - |
| Атипичные, всего | 11 | 10 | 12 | 6 | 8 | 11 |
| По группам Е.Н. Runyon | | | | | | |
| вторая | - | 1 | - | - | - | 1 |
| третья | 2 | - | 6 | 1 | 2 | 3 |
| четвертая | 9 | 9 | 6 | 5 | 6 | 7 |

При патолого-анатомическом вскрытии животных из неблагополучных по туберкулезу хозяйств макроскопически туберкулез выявлен у 3, или 4,9%, голов, что подтверждено бактериологическими исследованиями. У одного животного при отсутствии видимых изменений, характерных для тубер-

кулеза, была выделена культура *M. bovis* из подчелюстных и заглоточных лимфатических узлов. В трех случаях от животных получены смешанные культуры возбудителя туберкулеза и быстрорастиющих микобактерий.

В благополучных по туберкулезу сельскохозяйственных предприятиях в течение ряда лет выявляли реагирующих на туберкулин для млекопитающих животных, причем неоднократно проведенными патолого-анатомическими и бактериологическими исследованиями диагноз – туберкулез крупного рогатого скота – установлен не был.

При лабораторном исследовании секционного материала из этих хозяйств от 80 животных, убитых с диагностической целью, изолировали 19, или 23,7%, культур атипичных микобактерий II, III и IV групп по классификации Е.Н. Runyon. При бактериологическом исследовании проб молока и смывов с молочного оборудования получили 5, или 12,5%, культур атипичных микобактерий, дифференцированных как *M. diernhoferi*, *M. vaccae*, *M. phlei*.

Ветеринарно-санитарная экспертиза 80 туш крупного рогатого скота показала наличие у 17 из них в корковом слое подчелюстных, заглоточных и средостенных лимфоузлов гиперплазии, точечных и диффузных кровоизлияний.

Определенный интерес представляют данные о нахождении культур микобактерий в зависимости от характера патологического материала. У крупного рогатого скота поражения туберкулезного характера чаще всего локализовались в лимфатической системе. Так, из восьми животных с наличием изменений, характерных для туберкулеза, у шести специфический процесс формировался в заглоточных, подчелюстных и средостенных лимфоузлах, у двух – в брыжечных, которые как правило, не просматриваются ветеринарными специалистами мясокомбината.

Таким образом, от 244 животных, реагировавших на туберкулин для млекопитающих, 120 проб молока и смывов с молочного оборудования из хозяйств с различной эпизотической ситуацией по туберкулезу при бактериологиче-

ском исследовании получено 78 (21,4%) культур микобактерий, из них в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах изолировано 54, или 69,2%, культур, идентифицированных как *M. bovis* – 9 (16,6%), *M. gordonae* – 2 (3,7%), *M. avium* – 6 (11,1%), *M. terrae* – 1 (1,85%), *M. gastri* – 2 (3,7%), *M. fortuitum* – 5 (9,3%), *M. smegmatis* – 4 (7,4%), *M. phlei* – 4 (7,4%), *M. diernhoferi* – 2 (3,7%), *M. vaccae* – 3 (5,5%), *M. flavescens* – 3 (5,5%). В благополучных хозяйствах выделено 24 (30,8%) культуры атипичных микобактерий, идентифицированных как *M. avium* – 4 (16,6%), *M. terrae* – 2 (8,3%), *M. gordonae* – 1 (4,16%), *M. fortuitum* – 2 (8,3%), *M. smegmatis* – 3 (12,5%), *M. phlei* – 3 (12,5%), *M. diernhoferi* – 2 (8,3%), *M. vaccae* – 2 (8,3%), *M. flavescens* – 2 (8,3%). Видовая принадлежность определена только у 62 (79,5%) культур микобактерий, остальные 16 (20,5%) отнесены к IV группе по классификации Е.Н. Runyon.

Полученные данные свидетельствуют о широком распространении атипичных микобактерий среди крупного рогатого скота в Омской области не только в благополучных, но и в длительно неблагополучных по туберкулезу хозяйствах. Анализ видового состава атипичных микобактерий, выделенных от животных, реагировавших на туберкулин, из молока, смывов с молочного оборудования в хозяйствах, эпизоотически неблагополучных и благополучных по этой инфекции, указывает на определенное их сходство.

При бактериологическом исследовании проб диагностического материала, полученного от 244 животных (легкие, печень, лимфатические узлы), 60 проб молока и 60 проб-смывов с молочного оборудования, изолировали 78 культур микобактерий (табл. 2).

Идентификация культур была проведена по комплексу признаков, который включал изучение тинкториальных, культурально-морфологических, биохимических и патогенных свойств.

Для определения принадлежности изолированных культур к роду *Mycobacterium* из колоний, выросших на сре-

Таблица 2

Результаты бактериологического исследования

| Объекты исследований | Количество проб | Выделено культур микобактерий | | | | | |
|----------------------------------|-----------------|-------------------------------|--------------|----------------------------------|----|-----|----|
| | | всего | бычьего вида | атипичных по группам Е.Н. Runyon | | | |
| | | | | всего | II | III | IV |
| Пробы диагностического материала | 244 | 67 | 9 | 58 | 2 | 14 | 42 |
| Молоко | 60 | 5 | - | 5 | - | 1 | 4 |
| Смывы с молочного оборудования | 60 | 6 | - | 6 | 1 | - | 5 |
| Итого | 364 | 78 | 9 | 69 | 3 | 15 | 51 |

де Левенштейна-Йенсена, готовили мазки, которые окрашивали по Циллю-Нильсену и устанавливали наличие кислотоустойчивости у микробов изучаемого штамма, а также его чистоту. Все культуры, идентифицированные как *M. bovis*, имели вид коротких, иногда зернистых палочек длиной 2-3 мкм, рубиново-красного цвета. В шести случаях культуры возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота состояли из идентичных кислотоустойчивых клеток, т.е. их популяции были однородными. В трех случаях культуры были смешанными, наряду с типичными палочками встречались более крупные, зернистые, кислотоустойчивые клетки, а также палочки, обладающие частичной кислотоустойчивостью. Популяции микобактерий комплекса *avium-intracellularae* состояли из длинных, тонких, кислотоустойчивых палочек, образующих большие скопления диффузно расположенных клеток.

Быстрорастущие микобактерии, в отличие от микобактерий туберкулеза бычьего вида, имели разнообразную форму, величину и расположение, что соответствует литературным данным. Следует указать, что эти микобактерии обладают более выраженным полиморфизмом, некоторые из них теряют кислотоустойчивость и окрашиваются в синне-голубой цвет.

Для дифференциации возбудителя туберкулеза круп-

ного рогатого скота от атипичных микобактерий в препаратах, окрашенных по Цилю-Нильсену, применяли метод Л.Е. Скрыбиной (1955).

В опыте использовали 55 штаммов микобактерий, из них 45 получены при бактериологическом исследовании секционного материала, молока, смывов с молочного оборудования и 12 музейных штаммов (*M. bovis* шт. 8, *M. avium* шт. «Берлин», шт. 19, *M. intracellulareae*, *M. gastri*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. diernhoferi*, *M. phlei*, *M. vaccae*, *M. flavescens*).

Проведенными исследованиями установлено, что микобактерии туберкулеза бычьего и птичьего видов не обесцвечиваются под действием 0,01%-го раствора гипохлорита калия. Однако отдельные клетки частично теряют кислотоустойчивость и приобретают розово-фиолетовую окраску. Таким образом, микобактерии туберкулеза бычьего и птичьего видов не обесцвечиваются «жавелевой водой» в течение 45 мин.

При изучении культур атипичных микобактерии, принадлежащих ко II, III и IV группам по классификации Е.Н. Runyon, установили, что *M. intracellulareae*, так же как и *M. avium*, практически не обесцвечиваются раствором гипохлорита калия. Лишь в некоторых препаратах встречаются единичные клетки с частичной кислотоустойчивостью. Вероятно, это объясняется тем, что по своей биохимической природе *M. intracellulareae* схожи с микобактериями птичьего вида.

M. gastri, *M. gordonae*, *M. terrae* также проявляют устойчивость к воздействию «жавелевой воды», но в меньшей степени, чем микобактерии комплекса *avium-intracellulareae*. В популяциях этих микроорганизмов обесцвечивается до 50% клеток.

Быстрорастущие микобактерии *M. smegmatis*, *M. diernhoferi*, *M. vaccae*, *M. phlei* обесцвечиваются раствором гипохлорита калия в 95% случаев, что соответствует результатам автора метода. Потенциально патогенный микроорга-

низм *M. fortuitum* проявляет повышенную резистентность к данному раствору в сравнении с другими представителями IV группы по Е.Н. Runyon. Так, из 7 штаммов только 4 теряют кислотоустойчивость, остальные обесцвечиваются в 75% случаев. Результаты исследований приведены в табл. 3.

Апробация бактериоскопического метода Л.Е. Скрыбиной показала, что данный метод приемлем только для дифференциации микобактерии туберкулеза от быстрорастущих микобактерии IV группы по Е.Н. Runyon. Дифференциация остальных групп микобактерии от возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота представляет определенные трудности.

Таблица 3

Результаты обесцвечивания микобактерий 0,01%-м раствором гипохлорита калия

| Культура | Число культур | | | Обесцветилось | | | | | |
|-------------------------|---------------|-----------|-------------------|--------------------|------------------|-----|-----|-----|--------|
| | всего | музей-ных | производ-ственных | количество культур | единичные клетки | 25% | 50% | 75% | 90-95% |
| <i>M. bovis</i> | 6 | 1 | 5 | - | 6+ | - | - | - | - |
| <i>M. avium</i> | 7 | 2 | 5 | - | 7+ | - | - | - | - |
| <i>M. intracellulae</i> | 1 | 1 | - | - | 1+ | - | - | - | - |
| <i>M. gordonae</i> | 5 | 2 | 3 | - | - | 5+ | - | - | - |
| <i>M. gastri</i> | 3 | 1 | 2 | - | - | 2+ | 1+ | - | - |
| <i>M. terrae</i> | 2 | - | 2 | - | - | 1+ | 1+ | - | - |
| <i>M. dierthoferi</i> | 3 | 1 | 2 | 3 | - | - | - | - | 3+ |
| <i>M. fortuitum</i> | 7 | 1 | 6 | 7 | - | | | 3+ | 4+ |
| <i>M. smegmatis</i> | 6 | 1 | 5 | 6 | - | - | - | - | 6+ |
| <i>M. vaccae</i> | 4 | 1 | 3 | 4 | - | - | - | - | 4+ |
| <i>M. phlei</i> | 6 | 1 | 5 | 6 | - | - | - | - | 6+ |
| <i>M. flavescens</i> | 5 | 1 | 4 | 5 | - | - | - | - | 5+ |
| Итого | 55 | 12 | 43 | 41 | 14 | 8 | 2 | 3 | 28 |

Примечание: «-» – микобактерии не обесцветились;

«+» – микобактерии обесцветились.

При наличии кислотоустойчивости у изолированных культур микобактерий далее изучали культуральные свойства. Изучение культурально-биохимических свойств проводили в первой генерации после пересева первичного роста (т.е. субкультур) на среду Левенштейна-Йенсена.

Для определения культуральных особенностей из исследуемых культур микобактерий готовили суспензии густотой 2-3 мг/мл, которые засевали в объеме 0,2-0,3 мл на шесть пробирок со средой Левенштейна-Йенсена. Посевы инкубировали в термостатах при разных температурных режимах (22, 37, 45, 52°C). Рост учитывали через 3, 5, 7, 14 дней и далее в течение 3 мес. Культуры считали быстрорастущими, если рост микобактерий (колоний) появлялся до 7-го дня инкубации при 37°C и по интенсивности и характеру совпадал с ростом контрольных штаммов. К медленно растущим относили микобактерии, у которых рост появлялся через 7 дней и был идентичным с контрольными штаммами.

Так, в наших исследованиях 51, или 65,4%, культур относятся к быстрорастущим микобактериям, остальные 27 (34,6%) – к медленно растущим. Из них 9 субкультур растут только при 37°C через 18-27 дней, рост других медленно растущих микобактерий появляется в сроки от 8 до 16 дней, у 10 культур при температуре 22, 37, 45°C и у 8 – при 22 и 37°C.

Следует отметить, что при посеве трех проб патологического материала от разных животных на среде Левенштейна-Йенсена вырастали смешанные культуры микобактерий, сроки появления которых были различными. Для дальнейшего их изучения произвели рассев с тем, чтобы получить изолированные колонии этих микроорганизмов. Макроскопическое исследование выросших колоний показало, что в одной и той же пробирке с пересевом находятся неоднородные популяции микобактерий. В двух случаях через 5 дней после пересева на среде появляются единичные, желтые, слизистые колонии, гладкие, влажные, непигментированные, слабо эмульгирующиеся в физиологическом растворе;

в другом случае наблюдали рост двух беспигментных культур в виде круглых, гладких, блестящих колоний, которые формируются к 27-му дню и в виде крошковатых колоний появляются через 5 дней после пересева. Таким образом, три штамма по скорости роста являются медленнорастущими, три – быстрорастущими.

Одновременно у субкультур определяли характер роста и пробу на фотохромогенез. Для этого из этих же суспензий, приготовленных для определения скорости роста, производили посевы каждого штамма на 3 пробирки со средой Левенштейна-Йенсена. В наших исследованиях из 27 медленнорастущих культур только 3 являются скотохромогенными, остальные – нефотохромогенными, из 51 быстрорастущей культуры 22 образуют пигмент как на свету, так и в темноте.

У 9 беспигментных культур отмечали медленный и умеренный рост только при 37°C. Семь культур растут в виде единичных, гладких, выпуклых колоний в S-форме и 2 культуры в виде шероховатых, сухих колоний в R-форме, цвета слоновой кости. Остальные 16 медленнорастущих культур дают рост при разных температурных режимах. Так, 10 нефотохромогенных культур растут при 22, 37, 45°C; 5 – при 22 и 37°C; 3 скотохромогенные культуры – при 22 и 37°C. У 8 нефотохромогенных культур при старении появляется желтая окраска, которая исчезает при пересеве на свежие среды.

Микобактерии, отнесенные к быстрорастущим, растут в виде мелких, средних или крупных единичных колоний, округлых, гладких, слизистых или крошковатых по консистенции, морщинистых, с неровными краями, с ярко выраженной пигментацией или без нее, т. е. характер роста микобактерий определяется их видом.

При посеве изучаемых культур микобактерий на мясопептонный бульон рост отмечался у всех культур, за исключением культур, идентифицированных как *M. bovis*. У быстрорастущих микобактерий он появлялся в течение 3-5 дней в виде поверхностного или придонного роста.

Для получения более полной характеристики микобактерий и с целью их дифференциации у изолированных культур изучали не только макроскопический, но и микроскопический рост на стеклах по методу Прайса с использованием среды Сотона. В качестве контроля использовали музейные культуры *M. bovis* шт. 8, *M. avium* шт. «Берлин», *M. intracellularae*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. diernhoferi*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. vaccae* и кислотоустойчивый сапрофит В-5. Из каждой культуры готовили суспензии с концентрацией микобактерий 1,0-1,5 млн в 1 мл. Для закрепления исследуемых культур на стеклах к растертой культуре добавляли стерильную сыворотку крупного рогатого скота. На 3 стерильных узких предметных стекла 3-4 раза толстым слоем наслаивали микобактериальную суспензию (объем: 1 капля – 0,02 мл). Препараты высушивали и укладывали в чашки Петри со средой, так чтобы она закрывала поверхность мазков, затем помещали в термостат при температуре 37°C. Мазки-препараты извлекали на 2, 5, 7 и 10-й день, отмывали от среды дистиллированной водой, окрашивали по Цилю-Нильсену и микроскопировали в иммерсионной системе.

Наблюдения показали заметную морфологическую разницу в характере и скорости роста микроколоний возбудителя туберкулеза и атипичных микобактерий. Наблюдая за развитием микроколоний *M. bovis*, отмечали, что уже через 46 ч микобактерии складываются группами по 3-4 клетки, некоторые из них имеют зернистость. К 5-7-му дню начинается процесс формирования жгутов, состоящих из интенсивно окрашенных по Цилю-Нильсену рубиново-красных палочек, расположенных параллельно оси жгута; к 10-му дню микроколонии увеличиваются и соединяются друг с другом, образуя скопления ячеистого строения. Необходимо отметить, что кроме типичных микроколоний, некоторые микобактерии образуют группы клеток, состоящие из зерен, осколков и других необычных форм.

При изучении микроскопического роста микобактерий комплекса *avium-intracellularae* установили, что эти микро-

организмы через 48 ч формируют небольшие скопления, состоящие из 5-7 кислотоустойчивых палочек, расположенных параллельно и под углом друг к другу. Через 3 дня микроколонии разрастаются и имеют вид скоплений из 20 и более кислотоустойчивых зернистых стройных длинных палочек, которые к 7-му дню представляют хорошо выраженные микроколонии, напоминающие по строению микроколонии возбудителя туберкулеза бычьего вида, но отличающиеся от них менее компактным расположением клеток, морфологией и их полиморфизмом.

Скотохромогенные микобактерии (*M. gordonae*) формируют микроколонии, состоящие из полиморфных кислотоустойчивых зернистых палочек, расположенных, как правило, под углом друг к другу, и в те же сроки, что и микобактерии комплекса *avium-intracellulerae*.

Образование микроколоний у быстрорастущих микобактерий происходит значительно быстрее. Так, *M. fortuitum*, *M. diernhoferi*, *M. smegmatis*, *M. vaccae*, *M. phlei* и кислотоустойчивый сапрофит В-5 уже через 48 ч представляют собой большие скопления клеток разной морфологии. К 3-5-му дню микроколонии разрастаются и занимают иногда все поле зрения. Если сроки появления микророста были идентичными у всех быстрорастущих микобактерий, то характер его был различным. Интересно отметить, что некоторые штаммы *M. fortuitum*, обладающей потенциальной патогенностью для человека, и кислотоустойчивый сапрофит *M. diernhoferi* формируют микроколонии в виде рыхлых жгутов или тяжей, состоящих из полиморфных зернистых и незернистых кислотоустойчивых палочек, а также палочек с частичной кислотоустойчивостью. *M. smegmatis*, *M. vaccae*, *M. phlei* и В-5 дают рост на стеклах в виде обильно разросшихся войлокообразных скоплений, в которых присутствуют неравномерно окрашенные по Цилю-Нильсену клетки разной морфологии.

Несмотря на некоторую морфологическую разницу в формировании микроколоний, полученные результаты

свидетельствуют, что феномен кордообразования не дает возможности дифференцировать возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота от микобактерий комплекса *avium-intracellulae* и других атипичных микобактерий.

Для дифференциации микобактерий туберкулеза бычьего вида от остальных микобактерий использовали тесты, позволявшие выявить у них устойчивость к салицилату, парааминосалицилату и хлориду натрия. Для этого взвесив микобактерий, приготовленную из каждого изучаемого штамма, густотой 2-3 мг/мл в объеме 0,2 мл засеивали на 8 пробирок со средой, содержащей салицилат натрия в 0,05 и 0,1%-й концентрации; на 2 пробирки со средой, содержащей 0,2% парааминосалицилата натрия; на 2 пробирки со средой, содержащей 5% хлорида натрия, и на 2 пробирки со средой без добавления препаратов (контроль). Применение данных тестов позволило отнести 9 культур к микобактериям туберкулеза, остальные 69 – к атипичным микобактериям. Более подробно результаты дифференциации микобактерий с использованием питательных сред рассмотрены в разделе 2.3.

В результате изучения культурально-морфологических и тинкториальных свойств 78 культур установили, что 9 (11,6%) из них являются микобактериями туберкулеза, 3 (3,8%) относятся ко II группе по классификации Е.Н. Runyon, 15 (19,2%) культур – к III и 51 (65,4%) принадлежат к IV группе (табл. 4).

После того как культуры были дифференцированы на микобактерии туберкулеза и атипичные микобактерии, а последние отнесены к различным группам по классификации Е.Н. Runyon, приступили к их идентификации.

С этой целью использовали комплекс биохимических тестов, который включает определение ниацина, редукции нитратов, гидролиза твин-80, амидазной и арилсульфатазной активности, активности каталазы и деградации салицилата или парааминосалицилата натрия. Для установления видовой принадлежности использовали и биологическую

Таблица 4

**Культуральные свойства микобактерий, выделенных
из секционного материала, молока, смывов с молочного
оборудования**

| Наименование | Микобактерии туберкулеза | Атипичные | | | |
|---|--------------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | | медленнорастущие | | быстрорастущие | |
| | | скотохромогенные | нефотокромогенные | скотохромогенные | нефотокромогенные |
| Количество культур | 9 | 3 | 15 | 22 | 29 |
| Скорость роста, дней | 18-27 | 8-16 | 8-16 | 3-5 | 3-5 |
| Отношение к свету, пигмент | Нет пигмента | Оранжевый | Нет пигмента | Желто-оранжевый | Нет пигмента |
| Рост при температуре, °С | | | | | |
| 22 | - | + | +(15) | + | + |
| 37 | + | + | +(10) | + | + |
| 45 | - | - | +(5) | ±2 | - |
| 52 | - | - | - | - | - |
| Рост на среде Левенштейна-Йенсена с добавлением 0,05 и 0,1% салицилата натрия | - | + | + | + | + |
| 0,2% ПАСК | - | + | + | + | + |
| 5% хлорида натрия | - | - | - | + | ±3 |

Примечания. 1. Цифрами в скобках обозначено число штаммов микобактерий, растущих при данной температуре.

2. Большинство штаммов не растут при данной температуре.

3. Большинство штаммов растут на среде Левенштейна-Йенсена с 5% хлорида натрия.

пробу. При исследовании биохимической активности культур, отнесенных по культурально-морфологическим и биологическим свойствам к микобактериям туберкулеза бычьего вида, получили следующие результаты: культуры являются ниацिनотрицательными; не имеют нитратредук-

тазу, никотин- и пиразинамидазу; амидазная активность положительна только в отношении мочевины; обладают арилсульфатазной и слабо выраженной каталазной активностью, которая при нагревании до 68°C в течение 30 мин исчезает. Результаты по определению ферментативной активности данных культур, приведенные в табл. 5, свидетельствуют, что они являются микобактериями туберкулеза бычьего вида, и совпадают с результатами бактериологического и биологического исследований.

Таблица 5

Биохимические свойства микобактерий, выделенных из секционного материала, молока, смывов с молочного оборудования

| Вид микобактерий | Число штаммов | Ниациновая проба | Редукция нитратов | Амидный ряд | Гидролиз твина-80 | Арилсульфатазная активность | Термостабилизация каталазы | Разрушение ПАСК до катехоламинов |
|-----------------------|---------------|------------------|-------------------|-------------|-------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| <i>M. bovis</i> | 9 | - | - | 3 | - | + | - | - |
| <i>M. avium</i> | 10 | - | - | 5,6 | - | - | + | - |
| <i>M. gastri</i> | 2 | - | - | 3,5 | - | + | - | - |
| <i>M. terrae</i> | 3 | - | + | - | + | + | + | - |
| <i>M. gordonae</i> | 3 | - | - | 3 | + | + | + | - |
| <i>M. fortuitum</i> | 7 | - | + | 1,3,8 | +4(3)* | + | + | + |
| <i>M. smegmatis</i> | 7 | - | + | 1,2,3,4, | + | + | + | - |
| | | | | 5,6,9 | | | | |
| <i>M. phlei</i> | 7 | - | + | 3,5,6 | + | + | + | - |
| <i>M. vaccae</i> | 5 | | +(2) | 1,2,3,4 | + | + | + | - |
| | | | -(3) | 5,6,8 | | | | |
| <i>M. diernhoferi</i> | 4 | | +(1) | 1,3,5,6 | - | + | - | - |
| | | | -(3) | | | | | |
| <i>M. flavescens</i> | 5 | - | + | 5,6 | + | + | + | - |

Примечания: 1. Амидный код: 1 – ацетамид, 2 – бензамид, 3 – мочевины, 4 – изоникотинамид, 5 – никотинамид, 6 – пиразинамид, 7 – салициламид, 8 – аллантоин, 9 – сукцинамид, 10 – малонамид. 2. +4 (3)* – 4 штамма *M. fortuitum* гидролизуют твин-80, 3 штамма – нет.

У трех пигментированных медленнорастущих культур, дифференцированных как скотохромогенные, дающих рост при 22 и 37°C, основными отличительными признаками кроме роста при двух температурных режимах и пигмента являются: отрицательная ниациновая проба, наличие арилсульфатазы, отсутствие нитратредуктазы, способность гидролизовать твин-80 и ферментировать мочевины. Эти признаки характерны для *M. gordonae*. Такие же свойства наблюдали у музейного штамма *M. gordonae*.

Из 15 нефотохромогенных культур, растущих в сроки от 8 до 16 дней, 10 характеризуются интенсивным ростом при 37 и 42°C и скудным ростом при 22°C, отсутствием ниацина, нитратредуктазы, гидролиза твина-80, отрицательной арилсульфатазной активностью, наличием каталазы после нагревания до 68°C в течение 30 мин, ферментативным распадом сукцината, аллантаина, положительной реакцией с никотиномидом и пиразинамидом. Результаты первичной дифференциации и результаты биохимической активности этих культур позволили отнести их к комплексу *avium-intracellulae*. Следует отметить, что использование культуральных и биохимических методов без проведения биологической пробы на кроликах и курах не дает возможности дифференцировать *M. avium* от *M. intracellulae*. После заражения кроликов и кур культуры были отнесены к микобактериям туберкулеза птичьего вида.

Пять других нефотохромогенных культур также были ниацинотрицательными, росли на средах Левенштейна-Йенсена и мясопептонном агаре в сроки от 8 до 16 дней, но их рост появляется только при двух температурных режимах: 22 и 37°C. Три из них восстанавливают нитраты, гидролизуют твин-80 в течение 5 дней, имеют арилсульфатазу и положительную реакцию на каталазу, в отношении амидов активность не проявляют, остальные 2 культуры, растущие при этих же температурах и в эти же сроки, также гидролизуют твин-80, имеют арилсульфатазу, но в отличие от предыдущих культур не редуцируют нитратредуктазу, не

обладают каталазной активностью, ферментируют никотинамид и уреазу. Все 5 культур растут на среде Левенштейна-Йенсена с салицилатом натрия и не дают роста на среде с 5%-м содержанием хлорида натрия. При заражении морских свинок патогенных свойств они не проявляют. Анализируя свойства данных культур, первые 3 отнесли к *M. terrae* и 2 – к *M. gastri*.

Семь быстрорастущих беспигментных культур микобактерий обильно растут в виде шероховатых колоний на среде Левенштейна при 22 и 37°C и одна из них растет при 42°C. Эти культуры дают рост на среде с салицилатом и хлоридом натрия, обладают арилсульфатазной (после 3 суток), нитратредуктазной и хорошо выраженной каталазной активностью, из амидов все культуры дезаминируют уреазу, ацетамид, аллантоин и один штамм — никотинамид. Четыре штамма гидролизуют твин-80 через 3 дня, 3 не вступают в реакцию с твином. При посеве суспензий исследуемых культур на среду Левенштейна-Йенсена с 0,2%-м содержанием ПАСК после инкубации при 37°C в течение 8-16 дней происходит почернение среды, так как эти микобактерии разлагают парааминосалицилат с образованием формазана. Для морских свинок культуры не являются патогенными. На основании полученных результатов выделенные культуры идентифицировали как *M. fortuitum*.

Семь беспигментных культур хорошо растут на средах Левенштейна-Йенсена и мясопептоном бульоне в сроки от 3 до 5 дней при температуре 22, 37, 45°C, проявляют устойчивость к салицилату и хлориду натрия. Культуры обладают широким амидазным спектром, ферментируя все 6 амидов малого ряда (ацетамид, мочевиноу, никотинамид, пиразинамид, сукцинамид, формамид), гидролизуют твин-80 в течение 3-5 дней, восстанавливают нитраты и дают положительную реакцию в арилсульфатазном тесте. Каталазная активность оказалась одинаковой. Так, из 7 штаммов у 5 отмечается бурное выделение пузырьков газа, у остальных степень активности фермента была средней. Культуры не обладают

патогенностью для морских свинок. Аналогичные свойства наблюдали у референтного штамма *M. smegmatis*, что послужило основанием для того, чтобы данные культуры отнести к виду *M. smegmatis*.

Референтный штамм *M. phlei* и 7 быстрорастущих культур микобактерий дают интенсивный рост на средах Левенштейна-Йенсена и мясопептонном бульоне при 22, 37, 45 и 52°C в течение 3-5 дней с образованием желтого пигмента, как в темноте, так и на свету. Такой же рост наблюдали на среде Левенштейна-Йенсена с добавлением салицилата и хлорида натрия. Культуры редуцируют нитратредуктазу, гидролизуют твин-80 через 24-72 ч, проявляют каталазную и арилсульфатазную активность после 14 сут, ферментируют мочевины, никотинамид, пиразинамид и формамид, ПАСК не разлагают. Патогенностью выделенные культуры не обладают. На основании полученных данных исследуемые культуры идентифицировали как *M. phlei*.

Пять культур микобактерий и референтный штамм *M. vaccae* образуют желтый пигмент, особенно интенсивно на свету в процессе роста на средах Левенштейна-Йенсена и мясопептонном бульоне при 22 и 37°C, а также на средах с салицилатом и хлоридом натрия в сроки от 3 до 5 дней. Все штаммы вызывают гидролиз твина-80 в течение 24—48 ч, имеют положительную реакцию с ацетамидом, бензамидом, изоникотинамидом, мочевиной, никотинамидом, пиразинамидом, аллантином, формамидом; проявляют каталазную и арилсульфатазную активность. Два штамма восстанавливают фермент нитратредуктазу, остальные не обладают этой способностью.

Четыре культуры нефотохромогенных быстрорастущих микобактерий хорошо растут на МПБ и среде Левенштейна-Йенсена при 22 и 37°C. На этой же среде с 5%-м содержанием хлорида натрия микобактерии роста не дают. Культуры не гидролизуют твин-80, имеют слабую каталазную активность, ферментируют ацетамид, никотинамид, пиразинамид, мочевины. Арилсульфатазный тест у данных

культур положительный (через 24 сут). Три штамма не редуцируют нитратредуктазу, 1 штамм обладает этой способностью. Все культуры не разрушают салицилат и парааминосалицилат натрия с выделением формазана. Изучаемые культуры патологических изменений у морских свинок не вызывают. Полученные результаты позволили отнести данные культуры к виду *M. diernhoferi*.

Пять пигментированных культур растут на средах Левенштейна-Йенсена и мясопептонном бульоне при 22 и 37°C и 1 из них дает рост при 45°C в сроки от 3 до 5 дней с образованием желтого пигмента, образование которого не зависит от освещения. Хороший рост эти микобактерии дают на среде Левенштейна с салицилатом натрия и 5% хлорида натрия. Штаммы имеют хорошо выраженную каталазную и арилсульфатазную активность (через 14 сут), восстанавливают нитратредуктазу, гидролизуют твин-80 в течение 48-72 ч, из амидов в процессе роста используют никотинамид и пиразинамид; парааминосалицилат натрия эти культуры не разлагают. Идентичные свойства проявляет музейный штамм *M. flavescens*.

Таким образом, из 78 культур, выделенных из секционного материала крупного рогатого скота, реагировавшего на туберкулин, молока, смывов с молочного оборудования было идентифицировано 62 культуры микобактерий, из них: 9 культур *M. bovis*, 3 – *M. gordonae*, 10 – *M. avium*, 2 – *M. gastri*, 3 – *M. terrae*, 7 – *M. smegmatis*, 7 – *M. fortuitum*, 7 – *M. phlei*, 5 – *M. vaccae*, 4 – *M. diernhoferi* и 5 культур *M. flavescens*. У 16 культур определена только групповая принадлежность по классификации Е.Н. Runyon.

Кроме культурально-морфологических, биохимических и биологических свойств, у изолированных культур определяли лекарственную чувствительность к туберкулостатическим препаратам I ряда: стрептомицину, ПАСК, изониазиду. Определение чувствительности проводили путем выращивания культур микобактерий на среде Левенштейна-Йенсена (без крахмала, так как он адсорбирует лекарствен-

ные препараты), содержащей различные концентрации препаратов: 100, 50, 10, 5 и 1 мкг/мл. Для контроля эти же культуры выращивали на среде без добавления препаратов. Взвесь микобактерий для посева готовили по бактериологическому стандарту (500 мл микробных тел в 1 мл физиологического раствора), затем разводили 1:10 и в дозе 0,2 мл засеивали в каждую пробирку. Результаты оценивали по мере появления роста микобактерий в контрольных пробирках. Микобактерии считали устойчивыми при росте на среде, содержащей стрептомицин в концентрации 5 мкг/мл, изониазид и ПАСК в концентрации 1 мкг/мл.

Результаты исследований, представленные в табл. 6, показывают, что 53 культуры (85,5%) атипичных микобактерий являются резистентными ко всем разведениям изониазида, ПАСК и 43 культуры (69,4%) – устойчивыми к стрептомицину. Девять культур (14,5%) микобактерий туберкулеза бычьего вида проявляют тройную чувствительность к данным препаратам.

Таблица 6

**Лекарственная устойчивость микобактерий
к туберкулостатическим препаратам**

| Вид микобактерий | Число исследованных культур | Из них резистентных к | | | | | |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|-----|------------|-----|-------|-----|
| | | стрептомицину | | изониазиду | | ПАСК | |
| | | число | % | число | % | число | 100 |
| <i>M. avium</i> | 10 | 8 | 80 | 10 | 100 | 10 | Гкю |
| <i>M. gordonae</i> | 3 | 1 | 33 | 3 | 100 | 3 | 100 |
| <i>M. gastri</i> | 3 | 1 | 33 | 3 | 100 | 3 | 100 |
| <i>M. terrae</i> | 2 | 2 | 100 | 2 | 100 | 2 | 100 |
| <i>M. fortuitum</i> | 7 | 7 | 100 | 7 | 100 | 7 | 100 |
| <i>M. smegmatis</i> | 7 | 6 | 86 | 7 | 100 | 7 | 100 |
| <i>M. phlei</i> | 7 | 7 | 100 | 7 | 100 | 7 | 100 |
| <i>M. vaccae</i> | 5 | 4 | 80 | 5 | 100 | 5 | 100 |
| <i>M. flavescens</i> | 5 | 4 | 80 | 5 | 100 | 5 | 100 |
| <i>M. diernhoferi</i> | 4 | 4 | 100 | 4 | 100 | 4 | 100 |
| <i>M. bovis</i> | 9 | — | — | — | — | — | — |
| Итого | 62 | 43 | | 53 | | 53 | |

Таким образом, изучение культурально-морфологических и биохимических методов показало, что для дифференциации *M. bovis* от атипичных микобактерий целесообразно использовать бактериоскопию, скорость роста при разных температурных режимах, пигментообразование; тесты с 5%-м хлоридом натрия, ниациновый; редукцию нитратов. Для определения видовой принадлежности выделенных культур микобактерий, кроме указанных тестов, необходимы определение амидазной и арилсульфатазной активности, гидролиз твина-80.

2.3. Дифференциация микобактерий на питательных средах

Для дифференциации выделенных культур микобактерий использовали 6 тестов, предложенных М. Tsukamura, D. Kestle et al. и А.А. Прозоровым:

- 1) определение чувствительности культур микобактерий к салицилату натрия в 0,05 и 0,1%-й концентрации;
- 2) определение чувствительности культур микобактерий к парааминосалицилату натрия в 0,2%-й концентрации;
- 3) определение устойчивости культур микобактерий к 5%-му хлориду натрия;
- 4) тест деградации салицилата натрия;
- 5) тест деградации ПАСК;
- 6) определение роста микобактерий на средах Левенштейна-Йенсена и Петраньяни, приготовленных с добавлением кислотно-основных индикаторов (смеси красок нейтральрота и малахитовой зелени).

Целью исследований было изучение достоверности указанных методов для дифференциации микобактерий. Для этого использовали яичные среды Левенштейна-Йенсена и Петраньяни с добавлением вышеперечисленных препаратов. Контролем служили те же среды без препаратов. Контрольные среды готовили одновременно с опытными.

Указанными тестами исследовали 69 культур произ-

водственных и музейных штаммов, из них 11 – *M. bovis*, 12 – *M. avium*, 1 – *M. intracellularea*, 2 – *M. terrae*, 3 – *M. gastris*, 4 – *M. gordonae*, 7 – *M. phlei*, 7 – *M. smegmatis*, 8 – *M. fortuitum*, 5 – *M. flavescens*, 5 – *M. vaccae*, 4 – *M. diernhoferi*.

Из каждой культуры готовили микобактериальную суспензию густотой 2-3 мг/мл, которую высевали в объеме 0,2-0,3 мл на 12 пробирок со средой Левенштейна-Йенсена (9 пробирок с препаратами и 3 без них) и на 6 пробирок со средой Петраньяни (3 с красителями и 3 без них). Опыт проводили в 3-кратной повторности. Всего произведено 1347 посевов, из них 3105 на среду Левенштейна-Йенсена и 1242 на среду Петраньяни. Пробирки с посевами парафинировали на 3-й день и помещали в термостат при температуре 37°C. Учет роста культур производили ежедневно. Рост на средах с препаратами сравнивали с ростом этих же культур на контрольных средах. Его интенсивность оценивали в крестах (+) по Г.Н. Першину: (+) – скудный рост (единичные колонии – до 10); (2+) – умеренный рост (10-30 колоний); (3+) – хороший рост (до 100 колоний); (4+) – обильный (сливной) рост. Полученные результаты представлены в табл. 7.

Из литературных данных известно, что салицилат натрия в 0,05-0,1%-й концентрации и ПАСК в 0,2%-й концентрации оказывают губительное действие на микобактерии туберкулеза человеческого и бычьего видов. Все атипичные микобактерии, в том числе микобактерии птичьего вида, растут на среде с добавлением этих препаратов.

Результаты исследований показали, что из 11 культур микобактерий туберкулеза бычьего вида полная задержка роста происходит только у 7 штаммов, у 4 наблюдается рост единичных колоний (2-3), которые появляются на среде на 4-7 дней позднее, чем в контроле. Все остальные атипичные культуры растут на среде Левенштейна-Йенсена как с добавлением салицилата натрия, так и с добавлением ПАСК.

Однако у 6 культур нефотохромогенных микобактерий из 18 относящихся к III группе по классификации Е.Н. Run-

Таблица 7

Культурально-биологические свойства микобактерий

| Группы микобактерий | Вид микобактерий | Число штаммов | Рост на средах Левенштейна-Йенсена с | | | | Разрушение | |
|---------------------------------------|--------------------------|---------------|--------------------------------------|------|-----------|--------------------|--------------------|------|
| | | | салицилатом натрия | | ПАСК 0,2% | хлоридом натрия 5% | салицилатом натрия | ПАСК |
| | | | 0,05% | 0,1% | | | | |
| Микобактерии туберкулеза | <i>M. bovis</i> | | 7(-)* | 7(-) | 7(-) | | | |
| | | 11 | 4(+) | 4(+) | 4(+) | 11(-) | - | - |
| Медленно-растущие (нефотохромогенные) | <i>M. avium</i> | 12 | + | + | - | - | - | - |
| | <i>M. intracellulare</i> | 1 | + | + | - | - | - | - |
| | <i>M. terrae</i> | 3 | + | + | - | - | - | - |
| | <i>M. gastri</i> | 4 | + | + | - | - | - | - |
| Медленно-растущие (скотохромогенные) | <i>M. goodii</i> | 4 | + | + | + | | | |
| Быстрора-стущие | <i>M. smegmatis</i> | 7 | + | + | + | + | | - |
| | <i>M. phlei</i> | 7 | + | + | + | + | - | |
| | <i>M. fortuitum</i> | 8 | + | + | + | + | + | + |
| | <i>M. vaccae</i> | 5 | + | + | + | + | - | - |
| | <i>M. flavescens</i> | 5 | + | + | + | + | - | - |
| | <i>M. diernhoferi</i> | 4 | + | + | + | - | - | - |
| Всего | 69 | | | | | | | |

Примечание. Рост: (-) – отсутствие роста микобактерий; (+) – рост микобактерий.

Разрушение: (-) – микобактерии не разрушают салицилат и парааминосалицилат натрия; (+) – микобактерии разрушают салицилат и парааминосалицилат натрия.

yon (*M. avium*, *M. intracellulae*, *M. gastri*), отмечали незначительную задержку роста и снижение его интенсивности с хорошего (3+) в контроле до умеренного (2+) в эксперименте. Культуральные свойства выросших культур микобактерий были идентичными как в опыте, так и в контроле.

Полученные данные свидетельствуют, что салицилат и парааминосалицилат натрия (ПАСК) не всегда подавляют рост микобактерий туберкулеза бычьего вида, что затрудняет оценку результатов теста. Учитывали результаты теста по принципу оценки результатов по определению лекарственной чувствительности, например, культура считается чувствительной, если в пробирке со средой, содержащей туберкулоостатик, вырастает менее 20 колоний при обильном росте в контроле. При наличии более 20 колоний культура расценивается как устойчивая к той концентрации препарата, которая содержится в среде. Поэтому при оценке результатов теста появление единичных колоний не учитывали, а дающие такой рост культуры считали чувствительными к данным препаратам.

Хлорид натрия в 5%-й концентрации полностью ингибирует рост всех штаммов микобактерий туберкулеза бычьего вида и всех медленно растущих атипичных микобактерий. Из быстрорастущих микобактерий на этой среде не растет только кислотоустойчивый сапрофит *M. diernhoferi*, остальные виды дают интенсивный рост, не отличающийся от роста в контроле.

Использование сред Петраньяни и Левенштейна-Йенсена с двумя красителями (нейтральрот и малахитовая зелень) не дает возможности правильно провести дифференциацию микобактерий туберкулеза бычьего вида от остальных микобактерий. Так, в наших исследованиях цвет сред изменяется на 3-7-й день не только при посеве на них быстрорастущих, но и медленно растущих микобакте-

рий, принадлежащих ко II и III группам по классификации Е.Н. Runyon. В 27,2% случаев среды Левенштейна и Петраньяни окрашиваются в фиолетовый цвет при посеве на них микобактерий туберкулеза бычьего вида. При хранении сред в холодильнике в течение 5-12 дней они также приобретают фиолетовый цвет и становятся непригодными к работе.

При изучении теста деградации салицилата и парааминосалицилата натрия установили, что все 58 исследуемых штаммов атипичных микобактерий растут на среде Левенштейна-Йенсена с добавлением этих препаратов. Наибольшую интенсивность роста проявляют культуры быстрорастущих микобактерий. Шесть штаммов из 8, идентифицированных как *M. fortuitum*, на 8-11-й день расщепляют салицилат натрия с изменением цвета среды на темно-серый и 2 штамма на 13-й день окрашивают среду в серый цвет. Прочие микобактерий не обладают способностью разрушать этот препарат до образования формазана. Разрушение парааминосалицилата натрия, сопровождающееся почернением среды на 12-й день, вызывают 5 культур из 7, еще 2 меняют цвет среды только на 18-й день.

Как показали исследования, из всех изучаемых тестов наиболее достоверные и стабильные результаты дают тесты определения устойчивости микобактерий к 5%-му хлориду натрия, деградации салицилата и парааминосалицилата натрия. При посеве микобактерий туберкулеза бычьего вида на среды с добавлением салицилата натрия или ПАСК необходимо учитывать возможность появления единичных колоний. Во избежание ошибок при дифференциации микобактерий туберкулеза от атипичных микобактерий необходимо использовать комплекс тестов, который позволит сделать правильное заключение о выделенной культуре микобактерий.

2.4. Дифференциация микобактерий при разных методах заражения лабораторных животных

При подкожном заражении свинок микобактериями

туберкулеза бычьего вида у всех животных 1, 2, 3 и 4-й групп на 5-6-й день в месте введения культуры развивается воспалительный инфильтрат, переходящий в дальнейшем в абсцесс. На 6-10-й день увеличиваются регионарные лимфатические узлы, достигающие через 30 дней размеров горошины. У свинок, зараженных микобактериями бычьего вида производственных штаммов (14, 92, 94), абсцессы вскрываются на 10-12-й день, и на их месте к 12-13-му дню появляются хорошо выраженные, незаживающие язвы с казеозными массами. У свинок 1-й группы, которым вводили микобактерии туберкулеза бычьего вида шт. 8, абсцессы вскрываются на 17-19-й день, язвы формируются на 22-23-й день, и их размеры несколько меньше, чем у животных 2, 3 и 4-й групп.

При подкожном введении морским свинкам 9-й и 10-й групп микобактерий бычьего вида в парафиновом масле на 5-6-й день у них также отмечается развитие инфекционного очага, который вскрывается через 2 недели в виде свища, но без образования язвы.

При интратестикулярном заражении морских свинок 5, 6, 7 и 8-й групп возбудителем туберкулеза крупного рогатого скота изменения в тестикулах проявляются на 5-6-й день гиперемией, повышением температуры кожи мошонки, болезненностью, увеличением и уплотнением семенника, в который вводили культуру микобактерий. Через 2 недели семенники увеличиваются в 2-3 раза и теряют способность подниматься в брюшную полость через паховый канал. Если при подкожном введении микобактерий туберкулеза бычьего вида в физиологическом растворе у морских свинок, как правило, развивается кожный дефект в виде язвы, то при интратестикулярном введении язвы формировались у 5 животных 5-й и 6-й групп, зараженных *M. bovis* шт. 14, 92. В коже и яичках морских свинок 1-6-й групп уже через 13-23 дня после введения культуральной суспензии развивается прогрессирующее туберкулезное воспаление с творожистым некрозом, распространением процесса на мышечную ткань

и развитием туберкулезного лимфангоита. Кожные дефекты в месте инокуляции культуры имеют размеры 1,0х1,5 см. Регионарные и отдаленные лимфатические узлы увеличиваются до 1 см и подвергаются тотальной казеификации.

Анализ сроков продолжительности жизни и индекса пораженности внутренних органов и лимфатических узлов у морских свинок, зараженных микобактериями туберкулеза бычьего вида (табл. 8, 9), показал, что при введении этих микобактерий в тестикулы гибель животных наступает на 7-12 дней раньше, чем при введении под кожу. Показатель продолжительности жизни в этом случае составляет $26,4 \pm 0,7$ дня, индекс пораженности по Тогуновой – $28,9 \pm 0,6$, а при введении под кожу – $35,1 \pm 1,2$ и $28,1 \pm 1,9$ соответственно. Зависимости между степенью пораженности органов и методом заражения мы не установили, о чем свидетельствуют средние показатели индекса пораженности (ИП).

Таблица 8

Показатели патогенности микобактерий туберкулеза бычьего вида при разных методах заражения морских свинок ($M \pm m$), $P < 0,0001$

| Штамм <i>M. bovis</i> | Метод заражения | | | |
|--------------------------|---------------------------|--------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | подкожный | | интратестикулярный | |
| | продолжит. жизни, дней | ИП по Тогуновой | продолжит. жизни, дней | ИП по Тогуновой |
| 8 | $33,3 \pm 0,9$ | $24,0 \pm 2,8$ | $26,0 \pm 1,2$ $r = -1$ | $27,6 \pm 0,6$ $r = +1$ |
| 14 | $32,3 \pm 1,5$ | $27,6 \pm 0,6$ | $2,5 \pm 2,8$ $r = +1$ | $28,3 \pm 0,6$ $r = +1$ |
| 92 | $37,3 \pm 2,5$ | $30,3 \pm 0,6$ | $28,3 \pm 1,9$ $r = +1$ | $30,3 \pm 0,6$ $r = +1$ |
| 94 | $34,6 \pm 1,2$ | $28,1 \pm 1,9$ | $26,4 \pm 0,7$ $r = +1$ | $28,9 \pm 0,61$ $r = +1$ |
| | $35,1 \pm 1,2$ | $28,1 \pm 1,9$ | $26,4 \pm 0,7$ $r = +0,8$ | $28,9 \pm 0,6$ $r = +0,94$ |

Кроме этого, у зараженных свинок в процессе заболевания отмечают снижение массы тела, что отражено в табл. 9. У погибших животных масса тела в среднем на 22% ниже уровня, зарегистрированного перед заражением.

Таблица 9

Показатели массы тела морских свинок при разных методах заражения микобактериями туберкулеза бычьего вида ($M \pm m$), $n = 3$, $P < 0,0001$

| Штамм <i>M. bovis</i> | Метод заражения | | | |
|-------------------------------------|-----------------|--------------|------------------------|-------------------------|
| | подкожный | | интратестикулярный | |
| | Масса тела, г | | | |
| | до заражения | при вскрытии | до заражения | при вскрытии |
| 8 | 326,0±4,6 | 253,0±7,7 | 310,0±7,7 r = −1,0 | 258,0±10,8 r = −0,9 |
| 14 | 321,0±2,1 | 262,0±4,6 | 321,0±1,5 r = +1,0 | 251,0±4,6 r = +0,5 |
| 92 | 332,0±4,0 | 262,0±2,7 | 316,0±7,1 r = +0,01 | 243,0±7,7 r = − 1 |
| 94 | 327,0±7,7 | 243,0±3,4 | 324,0±7,1 r = + 1,0 | 234,0 ± 7,7 r = +0,5 |
| | 326,0±2,6 | 255,0±4,5 | 317,0±3,3 r =−0,24 | 246,0±5,6 r =−+0,47 |
| Контроль (интактные животные) | 326,0±2,6 | 403,0±6,1 | 317,0±3,3 | 391,0±4,6 |

У всех морских свинок, зараженных подкожно и интратестикулярно микобактериями туберкулеза бычьего вида, развивается выраженный гепатолиенальный синдром, характеризующийся увеличением печени в 2-3 раза, селезенки – в 5-10 раз и наличием в этих органах большого количества туберкулезных очагов. В легких формируются многочисленные округлые, сероватые, полупрозрачные очажки размером от макового до просяного зерна, иногда крупнее. При введении микобактерий бычьего вида в тестикулы у всех свинок отмечаются изменения туберкулезного характера в семенниках. Они становятся плотными и увеличиваются в 2-3 раза. На разрезе видно, что яички спаяны с влагалищной оболочкой мошонки и содержат казеозные массы. При гистологическом исследовании в тестикулах регистрируется тотальный некроз, в противоположных тестикулах – различной степени атрофия сперматогенного эпителия.

Следует отметить, что при посеве патологического материала от свинок, зараженных интратестикалярно, высеваемость микобактерий всех штаммов бычьего вида, использованных в опыте, была значительно выше, чем при заражении под кожу.

Все изучаемые культуры атипичных микобактерий при интратестикалярном введении вызывают на 6-8-й день у морских свинок 5, 6, 7 и 8-й групп воспалительную реакцию, характеризующуюся гиперемией, увеличением семенника, повышением температуры кожи мошонки, болезненностью. При подкожном введении воспалительные инфильтраты размером 1,0x1,0 см развиваются у 5 свинок (у 2 при введении *M. avium*, у 2 при введении *M. phlei* и у 1 при введении *M. fortuitum*). К 15-18-му дню инфильтраты наблюдали у 2 свинок, зараженных *M. avium* подкожно, которые в дальнейшем вскрываются с образованием свищей. При интратестикалярном введении выраженная воспалительная реакция наблюдается у 6 свинок, из них: у 3 при введении *M. avium*, у 2 при введении *M. phlei* и у 1 при введении *M. fortuitum*. Через 30 дней инфильтраты отмечают у 4 свинок, 3 из них вводили суспензии микобактерий птичьего вида интратестикалярно и 1 подкожно. У этих же животных наблюдается увеличение и болезненность паховых лимфатических узлов. У 2 самцов, зараженных *M. fortuitum* и *M. phlei*, яички уменьшены в 1,5 раза.

При вскрытии 12 свинок, убитых на 30-й день после подкожного введения атипичных микобактерий, у 3 морских свинок, зараженных *M. avium*, установили увеличение селезенки в 1,5-2 раза без образования специфических туберкулезных бугорков, незначительное увеличение и гиперемию печени и кровоизлияние в легких. Регионарные паховые лимфатические узлы увеличены до размера горошины, уплотнены и содержат гнойные массы. У 2 из них инфильтраты в месте введения также содержат густой гной.

У остальных животных, зараженных *M. fortuitum*, *M. smegmatis* и *M. phlei*, макроскопические изменения, ха-

раактерные для туберкулеза, не выявляются, однако селезенка и паховый лимфатический узел у одной свинки, инфицированной *M. fortuitum*, незначительно увеличены.

В органах у 8 морских свинок, зараженных этими же культурами подкожно и убитых через 90 дней, видимые изменения туберкулезного характера отсутствуют; у свинки, инфицированной микобактериями птичьего вида, незначительно увеличена селезенка. Паховые лимфатические узлы уплотнены, увеличены у 2 животных, у 1 из них с гнойным содержимым.

При патолого-анатомическом вскрытии 9 свинок, зараженных интратестикулярно *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei* и убитых через 30 дней (по 3 свинки из каждой группы), видимые изменения, характерные для туберкулеза, отсутствуют. У 2 свинок, инфицированных *M. fortuitum*, и у 1 – *M. phlei*, селезенка увеличивается в 1,5-2 раза без образования туберкулезных бугорков, печень и легкие у всех свинок свободны от специфических изменений. Регионарные паховые лимфатические узлы у 2 свинок, зараженных *M. fortuitum*, увеличены, уплотнены и с гнойным содержимым, у 1 свинки в корковом слое почки находится абсцесс величиной с просяное зерно. В белочной оболочке яичек у этих животных наблюдаются единичные бугорки серовато-белого цвета. У 2 свинок, инфицированных микобактериями тимopheевой травы, увеличены паховые лимфатические узлы.

Микобактерии птичьего вида, введенные интратестикулярно, через 30 дней после заражения вызывают у морских свинок туберкулоподобные изменения в селезенке, печени, паховых лимфатических узлах и тестикулах. Так, у 2 свинок селезенка увеличена в объеме в 1,5-2 раза, масса ее также увеличивается в 2-3 раза. Если средняя масса селезенки у здоровых животных составляет 0,5 г, то в нашем случае она 1,5-2,0 г. В печени 2 свинок формируются некrotические очажки зеленовато-желтого цвета величиной с просяное зерно. Такие же изменения отмечены у 1 свинки

в селезенке. Поражений в легких не отмечалось ни в одном случае; семенники, в которые вводили микобактерии птичьего вида, увеличены в 2 раза, гиперемированы и в белочной оболочке находятся мелкие некротические очаги.

Через 3 мес патолого-анатомические изменения сохраняются лишь в тестикулах 2 самцов, зараженных *M. avium*, в виде единичных мелких инкапсулированных абсцессов, у одного из них абсцесс находится в паховом лимфатическом узле.

Из данных, приведенных в табл. 10, видно, что через 30 дней с начала опыта у морских свинок, зараженных культурами атипичных микобактерий подкожно, числовое значение селезеночного индекса (СИ) варьирует от $0,15 \pm 0,01$ до $0,25 \pm 0,01$. Самый высокий показатель регистрируется в группе животных, зараженных микобактериями птичьего вида, самый низкий – в группе свинок, инфицированных *M. smegmatis*.

Таблица 10

Селезеночный индекс при разных методах заражения морских свинок атипичными микобактериями ($M \pm m$), $n = 5$

| Вид мико- бактерий | Метод заражения | | | |
|--|-----------------------------------|-----------|--------------------|------------|
| | подкожный | | интратестикулярный | |
| | Убиты после заражения через, дней | | | |
| | 30 | 90 | 30 | 90 |
| <i>M. avium</i> | 0,25±0,01 | 0,14±0,01 | 0,36±0,02 | 0,16±0,02 |
| <i>M. smegmatis</i> | 0,15±0,10 | 0,10±0,01 | 0,15±0,01 | 0,11±0,003 |
| <i>M. fortuitum</i> | 0,20±0,02 | 0,12±0,01 | 0,30±0,01 | 0,13±0,01 |
| <i>M. phlei</i> | 0,22±0,01 | 0,12±0,01 | 0,26±0,003 | 0,12±0,01 |
| Контроль (незаражен- ные свинки) | 0,13±0,01 | 0,10±0,01 | 0,13±0,01 | 0,10±0,01 |

Через 90 дней у морских свинок, зараженных *M. avium*, этот показатель значительно снижается и приближается к норме, что свидетельствует об обратном развитии видимых изменений в организме лабораторных животных.

При интратестикулярном введении этих же культур

микобактерий числовое значение селезеночного индекса варьирует от $0,15 \pm 0,01$ в группе морских свинок, инфицированных *M. smegmatis*, до $0,36 \pm 0,02$ в группе животных, зараженных *M. avium*. У свинок, которым вводили *M. fortuitum*, показатель селезеночного индекса составляет $0,30 \pm 0,01$, а при подкожном введении – $0,20 \pm 0,02$. Через 90 дней значение селезеночного индекса приближается к норме.

В течение всего опыта не снижается масса тела зараженных атипичными микобактериями (табл. 11).

Таблица 11

Масса тела морских свинок при разных методах заражения атипичными микобактериями ($M \pm m$), $n=5$, $P<0,05$

| Вид микобактерий | Метод заражения | | | | | |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|------------|--------------------|-----------------|------------|
| | подкожный | | | интратестикулярный | | |
| | Масса тела, г | | | | | |
| | до заражения | после заражения | | до заражения | после заражения | |
| | | 30 дней | 90 дней | | 30 дней | 90 дней |
| <i>M. avium</i> | 335,0±2,8 | 396,0±1,5 | 510,0±10,1 | 341,0±2,5 | 388,0±4,9 | 505,0±5,0 |
| <i>M. smegmatis</i> | 327,0±4,5 | 383,0±4,6 | 510,0±10,1 | 337,0±3,0 | 399,0±3,1 | 518,0±6,5 |
| <i>M. fortuitum</i> | 328,0±4,5 | 394,0±4,0 | 506,0±11,5 | 330,0±4,3 | 396,0±9,5 | 513,0±7,5 |
| <i>M. phlei</i> | 320,0±3,7 | 365,0±4,0 | 519,0±14,5 | 314,0±4,9 | 373,0±9,5 | 516,0±10,5 |
| Контроль (незараженные животные) | 328,0±3,5 | 383,0±4,6 | 519,0±1,0 | 331,0±6,3 | 383,0±4,6 | 519,0±1,0 |

Гистологические исследования органов и лимфатических узлов животных, зараженных интратестикулярно микобактериями птичьего вида, через 30 дней показали, что альвеолярные стенки легких уплотнены за счет пролиферации макрофагов в интерстициальной ткани, в легких формируются единичные бугорки, состоящие из крупных одноядерных макрофагов, эпителиоидных клеток и большого количества полинуклеарных лейкоцитов. Бугорки диффузно

инфильтрованы лимфоцитами. В селезенке отмечается гиперплазия фолликулов, пролиферация макрофагов и образование небольших скоплений эпителиоидных клеток. В печени выявляются множественные гранулемы из макрофагов, лимфоидных клеток и некрозов, по периферии которых определяется эпителиоидно-клеточная реакция клеток типа фибробластов.

В большинстве случаев при интратестикулярном заражении свинок *M. avium* в семенниках и регионарных паховых лимфатических узлах образуются массивные некрозы со специфической для туберкулеза зоной клеток.

При подкожном методе заражения в месте введения суспензии и паховых лимфатических узлах наблюдается гнойное расплавление тканей, в которых выявляются структуры, соответствующие гранулематозному процессу. В легких, печени и селезенке свинок, зараженных подкожно, эти изменения выражены в значительно меньшей степени, чем у зараженных в тестикулы.

Через 3 мес у морских свинок, которым вводили *M. avium* в тестикулы, развивается интерстициальная пневмония, в зонах воспаления преобладают гистиоциты, фибробласты, фиброциты. В печени и селезенке отмечается утолщение капсул, у одной свинки в печени развивается гранулематоз в виде фиброзных узелков, по периферии которых располагаются лимфоидно-клеточные инфильтраты, в некоторых гранулемах встречаются гигантские клетки, в семенниках сохраняются инкапсулированные некрозы.

Следует отметить, что *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. smegmatis* обладают разной степенью патогенности, причем это различие более четко выявляется при интратестикулярном введении данных микобактерий. Так, *M. fortuitum* и *M. phlei* вызывают у животных интерстициальный пролиферативный процесс, на фоне которого формируются псевдотуберкулоидные структуры, характеризующиеся большим количеством лимфоцитов, гистиоцитов и гигантских многоядерных клеток. В селезенке свинок, зараженных этими

микобактериями, отмечаются параспецифические изменения, которые проявляются гиперплазией фолликулов, расширением венозных синусов, пролиферацией макрофагов и образованием мелких скоплений эпителиоидных клеток. В трех случаях в печени свинок развиваются гранулы, состоящие из макрофагов и лимфоидных клеток. В регионарных лимфатических узлах наблюдается гиперплазия лимфоидно-ретикулярной ткани. В центральных синусах формируются обширные лимфоидно-клеточные скопления и пролиферативный синусит. *M. smegmatis* таких изменений не вызывает.

В семенных канальцах самцов, зараженных *M. fortuitum*, *M. phlei*, развивается некроз сперматогенного эпителия вплоть до поражения клеток Сертоли. У четырех животных в тестикулах и их придатках находятся гранулемы, образованные клетками лимфоидного и эпителиоидного типа, окруженные капсулой, у двух из них, зараженных *M. fortuitum* – очаговые некрозы при сохранении тубулярного строения яичек.

К 90-му дню после интратестикулярного заражения свинок *M. fortuitum* и *M. phlei* ранее наблюдаемые изменения в легких, печени и селезенке редуцируются, в семенниках и их придатках у животных, зараженных *M. fortuitum*, сохраняются гранулемы, состоящие из макрофагов, единичных эпителиоидных клеток, гистиоцитов, фибробластов, фиброцитов. У одного из этих самцов сохраняются единичные инкапсулированные некротические очаги. Проведенные исследования показали, что процесс, развивающийся у морских свинок после заражения их *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, характеризуется развитием туберкулоподобных образований, которые имеют неспецифический клеточный состав. Интерстициальный процесс также носит неспецифический пролиферативный характер. Указанные изменения являются незначительными, так как животные практически остаются здоровыми, и могут быть расценены как тканевые реакции иммунитета в ответ на введение атипичных микобактерий.

Таким образом, использование интратестикулярного метода заражения позволяет выявлять потенциальную патогенность у атипичных микобактерий, а именно *M. avium*, *M. fortuitum* и *M. phlei*.

Необходимо отметить, что посевы биологического материала от морских свинок через 30 дней после заражения их в тестикулы *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. smegmatis* являются положительными в 50,0% случаев (табл. 12). Посевы внутренних органов и лимфатических узлов от свинок, зараженных этими же культурами под кожу, являются положительными только в 20% случаев, причем *M. smegmatis* не выделяется ни от одной свинки. Скорость роста культур микобактерий, изолированных от животных, зараженных разными методами, идентична, но интенсивность их роста несколько выше при посеве биоматериала от свинок, инфицированных интратестикулярно.

Таблица 12

**Высеваемость культур атипичных микобактерий
при разных методах заражения морских свинок**

| Вид микобактерий | Метод заражения | | | | | | | |
|---------------------|--|------|--------|---|--------------------|------|--------|------|
| | подкожный | | | | интратестикулярный | | | |
| | Высеваемость культур после заражения через, дней | | | | | | | |
| | 30 | | 90 | | 30 | | 90 | |
| | КОЛ-ВО | % | КОЛ-ВО | % | КОЛ-ВО | % | КОЛ-ВО | % |
| <i>M. avium</i> | 1 | 20,0 | - | - | 3 | 60,0 | 1 | 20,0 |
| <i>M. smegmatis</i> | - | - | - | - | 2 | 40,0 | - | - |
| <i>M. fortuitum</i> | 1 | 20,0 | - | - | 2 | 40,0 | - | - |
| <i>M. phlei</i> | 1 | 20,0 | - | - | 3 | 60,0 | 1 | 20,0 |

Сравнительное изучение интратестикулярного и подкожного методов заражения морских свинок микобактериями туберкулеза бычьего вида и атипичными микобактериями показало, что интратестикулярный метод позволяет:

- 1) ускорить бактериологическую диагностику туберкулеза;
- 2) выявить потенциальную патогенность у атипичных микобактерий (*M. avium*, *M. fortuitum*, *M. phlei*);

3) повысить высеваемость исходных культур из органов и тканей морских свинок, зараженных микобактериями туберкулеза бычьего вида и атипичными микобактериями.

У лабораторных животных при строго внутрикожном введении микобактерий туберкулеза бычьего вида (шт. 8, 14, 92, 94, 99, 100) на 5-6-й день появляются воспалительные инфильтраты: у морских свинок величиной с небольшую горошину, у кроликов с копеечную монету, характеризующиеся гиперемией, уплотнением тканей, повышением температуры, болезненностью в месте введения микобактериальной суспензии. Через 2 недели инфильтраты увеличиваются, уплотняются и в центре их развиваются кожные дефекты в виде некротических язв. К 20-му дню некротический фокус увеличивается и поражает нижележащие ткани, кожный дефект заполняется казеозными массами. К этому времени участки изъязвления кожи достигают в диаметре у свинок в области живота – $9,0 \pm 0,3$ мм, у кроликов в области наружного края уха – $10,0 \pm 2,8$, в области внутренней поверхности коленного и локтевого суставов – $10,6 \pm 0,3$ мм. На 35-е сутки эти показатели увеличиваются у свинок до $15,0 \pm 0,1$ мм, у кроликов на ушной раковине – до $17,6 \pm 0,5$ и на лапках – до $13,3 \pm 0,9$ мм. У 3 кроликов, кроме описанных выше признаков, наблюдается лимфангоит и появление везикулярных пузырьков по ходу центральной вены, у кроликов, зараженных в лапки, увеличиваются и уплотняются регионарные лимфатические узлы. На 55-е сутки у кроликов диаметр кожных поражений составляет на ухе $19,4 \pm 0,6$ мм, на лапках – $14,0 \pm 0,6$. В день гибели у свинок дефекты кожи имеют размеры $16,5 \pm 0,1$ мм, у кроликов – $19,4 \pm 0,6$ и $15,4 \pm 1,5$ мм соответственно. Гибель морских свинок при внутрикожном методе заражения от генерализованного туберкулеза наступает через $51,3 \pm 1,0$ дня с индексом пораженности внутренних органов и лимфатических узлов, равным $3,3 \pm 0,2$ мм при контрольном показателе $0,13 \pm 0,01$, у кроликов, зараженных в ухо, – через $86,0 \pm 3,0$ дня, у зараженных в лапки – через $101,0 \pm 2,8$ дня. Все показатели внутрикожного

заражения лабораторных животных микобактериями туберкулеза бычьего вида отражены в табл. 13-15.

Таблица 13

Интенсивность и продолжительность местных реакций при внутрикожном введении морским свинкам микобактерий туберкулеза бычьего вида ($M \pm m$), $P < 0,001$

| Штамм <i>M. bovis</i> | Диаметр кожного дефекта (мм) после заражения через, дней | | | Продолжительность жизни, дней | СИ |
|----------------------------------|--|----------------|----------------|-------------------------------|-----------------|
| | 20 | 35 | в день гибели | | |
| 8 | 8,7 \pm 0,1 | 12,0 \pm 0,3 | 14,9 \pm 0,1 | 49,3 \pm 3,7 | 3,4 \pm 0,15 |
| 14 | 10,0 \pm 1,2 | 18,0 \pm 1,2 | 19,0 \pm 0,1 | 48,0 \pm 1,5 | 3,9 \pm 0,2 |
| 92 | 9,3 \pm 0,1 | 15,0 \pm 0,3 | 16,0 \pm 1,2 | 51,6 \pm 2,1 | 2,8 \pm 0,18 |
| 94 | 9,0 \pm 1,2 | 15,0 \pm 0,3 | 18,0 \pm 0,3 | 54,3 \pm 0,1 | 3,0 \pm 0,1 |
| 99 | 8,3 \pm 0,1 | 15,0 \pm 1,2 | 16,0 \pm 1,2 | 51,3 \pm 2,4 | 3,5 \pm 0,2 |
| 100 | 9,0 \pm 0,1 | 16,0 \pm 0,3 | 16,0 \pm 0,3 | 53,0 \pm 1,8 | 3,5 \pm 0,2 |
| | 9,0 \pm 0,3 | 15,0 \pm 0,1 | 16,5 \pm 0,1 | 51,3 \pm 1,0 | 3,3 \pm 0,2 |
| Контроль (интактные животные) | | | | | 0,13 \pm 0,01 |

Таблица 14

Интенсивность и продолжительность местных реакций при внутрикожном заражении кроликов микобактериями туберкулеза бычьего вида по методу Fodor-Ferenczi в модификации Н.А. Александрова ($M \pm m$), $n=3$

| Штамм <i>M. bovis</i> | Диаметр кожного дефекта (мм) после заражения через, дней | | | | Продолжительность жизни, дней |
|--------------------------|--|----------------|-----------------|----------------|-------------------------------|
| | 20 | 35 | 55 | в день гибели | |
| 8 | 9,3 \pm 0,9 | 16,0 \pm 0,3 | 18,6 \pm 11,2 | 19,3 \pm 0,3 | 84,6 \pm 4,6 |
| 14 | 10,3 \pm 0,9 | 19,0 \pm 0,6 | 20,0 \pm 11,0 | 21,0 \pm 0,6 | 72,3 \pm 5,8 |
| 92 | 9,6 \pm 0,9 | 18,0 \pm 0,6 | 18,0 \pm 0,6 | 17,6 \pm 0,3 | 89,0 \pm 1,5 |
| 94 | 10,6 \pm 0,9 | 18,0 \pm 1,2 | 19,6 \pm 0,6 | 19,6 \pm 0,3 | 90,6 \pm 1,5 |
| 99 | 11,0 \pm 0,9 | 17,0 \pm 0,6 | 18,3 \pm 0,3 | 19,0 \pm 0,6 | 90,0 \pm 2,8 |
| 100 | 10,0 \pm 0,6 | 18,0 \pm 0,3 | 19,6 \pm 0,3 | 20,0 \pm 0,6 | 90,0 \pm 2,8 |
| | 10,0 \pm 2,8 | 17,6 \pm 0,5 | 19,0 \pm 2,8 | 19,4 \pm 0,6 | 86,0 \pm 3,0 |

Таблица 15

**Интенсивность и продолжительность местных реакций при
внутрикожном заражении кроликов микобактериями туберкулеза
бычьего вида по методу Tодао-Тодда ($M \pm m$), $n=3$**

| Штамма <i>M. bovis</i> | Диаметр кожного дефекта (мм) после заражения через, дней | | | | Продолжитель- ность жизни, дней |
|---------------------------|---|----------|----------|------------------|---------------------------------------|
| | 20 | 35 | 55 | в день гибели | |
| 8 | 10,0±0,6 | 13,0±0,3 | 12,6±0,3 | 13,3±0,3 | 105,0±4,3 |
| 14 | 11,0±0,3 | 15,0±1,2 | 16,6±0,3 | 18,3±0,3 | 96,0±2,5 |
| 100 | 11,0±0,9 | 12,0±0,6 | 14,0±0,6 | 14,6±0,3 | 103,0±2,8 |
| | 10,6±0,3 | 13,3±0,9 | 14,0±0,6 | 15,4±1,5 | 101,0±2,8 |

Как видно из данных табл. 13-15, наиболее выраженные кожные реакции развиваются у животных, зараженных микобактериями туберкулеза бычьего вида шт. 14. Кролики и морские свинки, зараженные микобактериями этого штамма, погибают в более короткие сроки и с более высоким индексом пораженности внутренних органов и лимфатических узлов в сравнении с животными, зараженными другими штаммами микобактерий. Все эти показатели позволили отнести данный штамм к высоковирулентному. Наиболее интенсивно и ярко местные поражения развиваются у кроликов, которым микобактерии вводили в кожу наружного края уха.

Таким образом, внутрикожное заражение лабораторных животных изучаемыми штаммами *M. bovis* во всех случаях вызывает у них раннюю, постоянно усиливающуюся местную реакцию с некрозами и язвами без их дальнейшего заживления.

Микобактерии птичьего вида шт. 19, 163, «Берлин», введенные морским свинкам и 18 кроликам, вызывают у них кожные реакции, различные по интенсивности и продолжительности. Так, у свинок на 5-й день появляются воспалительные инфильтраты размером 5-6 мм, которые к 10-му дню уплотняются и увеличиваются до 10,3±0,4 мм. На 7-8-й день в центре инфильтратов образуются неболь-

шие язвочки, к 10-му дню их размеры достигают $5,8 \pm 0,6$ мм. Через 20 дней кожные дефекты зарубцовываются, а инфильтраты рассасываются. Наиболее выраженные и длительные кожные реакции наблюдаются у свинок, зараженных микобактериями шт. 19 (табл. 16). Продолжительность кожных реакций у морских свинок, зараженных *M. avium*, составляет $19,7 \pm 1,3$ дня. В месте введения микобактерии птичьего вида обуславливают появление воспалительных инфильтратов и небольших язв, которые к 20-му дню подвергаются заживлению, в отличие от таковых у свинок, зараженных микобактериями бычьего вида.

Таблица 16

Интенсивность и продолжительность местных реакций при внутрикожном введении морским свинкам микобактерии туберкулеза птичьего вида ($M \pm m$), $n=3$

| Штамм <i>M. avium</i> | Изменения в месте введения культуры (мм) после введения культуры через, дней | | | | | | Продолжи- тель- ность, дней |
|--------------------------|---|---------|---------|---------|---------|---------|--------------------------------------|
| | инфильтрат | | | язва | | | |
| | 10 | 15 | 20 | 10 | 15 | 20 | |
| «Берлин» | 10,3±0,3 | 6,3±0,6 | 3,0±0,6 | 5,3±0,3 | 3,3±0,3 | - | 18,0±0,6 |
| 19 | 11,0±0,3 | 8,6±1,0 | 4,6±0,3 | 7,0±0,3 | 5,0±0,3 | 1,5±0,6 | 22,3±1,2 |
| 163 | 9,6±0,6 | 8,3±0,3 | 3,3±0,3 | 5,0±0,6 | 3,6±1,0 | - | 19,0±0,6 |
| | 10,3±0,4 | 7,7±0,7 | 3,6±0,5 | 5,8±0,6 | 3,9±0,5 | 0,5±0 | 19,7±1,3 |

Внутрикожное введение микобактерии туберкулеза птичьего вида кроликам в лапки вызывает у них на 3-6-й день образование воспалительных инфильтратов, которые в дальнейшем увеличиваются до размеров горошины. Увеличение и уплотнение инфильтратов происходит в течение двух недель. Особенностью реакции у кроликов на введение *M. avium* является быстрое увеличение площади воспаления и изъязвления кожи без образования казеозных масс, длительное сохранение кожной реакции с последующим заживлением через 30-34 дня. Кожные дефекты в виде изъязвления развиваются у кроликов через 10-12 дней и к 20-му дню имеют размер $9,6 \pm 0,8$ мм на ухе и $7,7 \pm 0,7$ мм на вну-

тренней поверхности лапок. Показатели интенсивности и продолжительности кожных реакций при интрадермальном заражении кроликов микобактериями птичьего вида приведены в табл. 17.

Таблица 17

Интенсивность и продолжительность местных реакций при внутрикожном введении морским кроликам микобактерий птичьего вида ($M \pm m$), $n=3$

| Штамм <i>M. avium</i> | Изменения в месте введения культуры (мм) после введения культуры через, дней | | | | | | Продолжи- тельность кожной реакции, дней |
|--------------------------|---|----------|---------|---------|---------|---------|--|
| | инфильтрат | | | язва | | | |
| | 10 | 20 | 30 | 10 | 20 | 30 | |
| Заражение в ухо | | | | | | | |
| «Бер- лин» | 12,3±0,3 | 12,6±0,3 | 7,3±1,0 | 5,6±1,2 | 9,6±1,2 | 4,6±1,0 | 33,3±2,1 |
| 19 | 14,0±0,6 | 16,3±1,0 | 9,3±0,3 | 8,0±1,2 | 9,9±1,2 | 5,0±0,6 | 31,6±0,3 |
| 163 | 13,3±1,2 | 14,3±0,3 | 6,6±1,0 | 6,0±0,6 | 8,3±1,0 | 3,6±0,6 | 33,0±0,8 |
| | 13,2±0,5 | 14,4±1,1 | 7,7±0,8 | 6,5±0,7 | 9,6±0,8 | 4,0±0,4 | 33,0±0,8 |
| Заражение в лапки | | | | | | | |
| «Бер- лин» | 9,0±1,2 | 10,0±0,6 | 6,0±0,6 | 3,6±0,6 | 7,0±0,6 | 4,0±0,6 | 31,0±0,6 |
| 19 | 11,6±1,0 | 12,3±0,3 | 6,3±0,3 | 4,6±0,3 | 9,3±1,0 | 4,3±0,6 | 31,3±0,3 |
| 163 | 10,6±1,5 | 12,0±0,3 | 5,6±1,0 | 5,0±1,0 | 7,0±0,7 | 3,3±0,3 | 31,5±0,7 |
| | 10,4±0,8 | 11,4±0,7 | 5,9±0,2 | 4,4±0,4 | 7,7±0,7 | 3,8±0,3 | 31,5±0,7 |

Из данных таблицы видно, что наиболее выраженные кожные реакции вызывают микобактерии шт. 19 как при заражении в лапки, так и при заражении в кожу уха. Более демонстративные внутрикожные реакции у кроликов развиваются при введении микобактерий птичьего вида в наружный край уха, чем при введении их во внутреннюю поверхность коленного или локтевого суставов. Так, через 20 дней после заражения размеры кожных дефектов (язв) у животных, зараженных в ухо, составляют $9,6 \pm 0,8$ мм, через 30 дней – $4,4 \pm 0,4$, а у кроликов, зараженных в лапки, – $7,7 \pm 0,7$ и $3,8 \pm 0,3$ мм соответственно. Продолжительность кожных

реакций у кроликов, инъецированных в ухо микобактериями шт. 19, составляет $33,0 \pm 0,8$ дня, у кроликов, инъецированных в лапки, этот показатель равняется $31,5 \pm 0,7$.

Остальные медленно растущие нефотохромогенные *M. gastri*, *M. terrae*, в отличие от *M. avium*, вызывают у морских свинок и кроликов кожные реакции, незначительные по интенсивности проявления и продолжительности. У кроликов воспалительные явления в месте введения культур исчезают через 6-12 дней, у одного кролика, инфицированного *M. gastri*, на ухе образовалась небольшая язвочка размером 3-5 мм, которая зарубцевалась к 12-му дню.

У морских свинок на 3-й день развиваются воспалительные инфильтраты величиной с маленькую горошину, исчезающие к 7-9-му дню.

При внутрикожном заражении скотохромогенными культурами (*M. gordonae*) у свинок появляются инфильтраты размером 5-6 мм, которые к 10-му дню увеличиваются до $10,1 \pm 0,7$ мм. К 5-7-му дню в центре инфильтратов образуются кожные изъязвления от 5 до 8 мм, заживающие через 13-15 дней (табл. 18).

Таблица 18

Интенсивность и продолжительность местных реакций при внутрикожном введении морским свинкам скотохромогенных микобактерий ($M \pm m$), $n=3$

| Штамм <i>M. gordonae</i> | Изменения в месте введения культуры (мм) после введения культуры через, дней | | | | | | Продолжительность кожной реакции, дней |
|-----------------------------|--|--------------------|--------------|--------------------|--------------|--------|--|
| | инфильтрат | | | язва | | | |
| | 10 | 15 | 20 | 10 | 15 | 20 | |
| Музейный | 11,1±1,0 | 6,3±0,3 | 4,3±0,3 | 8,6±0,3 | 4,0±0,6 | - | 15,6±0,6 |
| Штамм 125 | 9,0±0,06 10,1±0,7 | 6,6±1,2 7,5±0,9 | - 2,1±2,1 | 7,3±1,0 7,9±0,6 | - 2,0±2,0 | - - | 18,0±1,2 16,8±1,2 |

Более интенсивно реакции на введение *M. gordonae* проявляются у кроликов, зараженных в кожу ушной раковины. Поражения кожи в виде язв развиваются через 10-15 дней и к 20-му дню имеют размеры на ухе $11,1 \pm 0,4$ мм, на лапках – $9,3 \pm 0,3$. Видимые кожные реакции сохраняются на

внутренней поверхности лапок в течение $31,1 \pm 0,5$ дня, на ухе – $35,0 \pm 0,8$ (табл. 19).

Таблица 19

**Интенсивность и продолжительность местных реакций при
внутрикожном введении кроликам скотохромогенных
микобактерий ($M \pm m$), $n = 3$**

| Штамм <i>M. gor- donae</i> | Изменения в месте введения культуры (мм) после введения культуры через, дней | | | | | | Продол- житель- ность кожных реакций дней |
|-----------------------------------|---|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--|
| | инфильтрат | | | язва | | | |
| | 10 | 15 | 20 | 10 | 15 | 20 | |
| Заражение в ухо | | | | | | | |
| Музей- ный | 11,0±1,0 | 11,3±0,3 | 7,0±0,6 | 8,6±0,3 | 9,9±0,6 | 6,0±0,6 | 36,6±0,9 |
| 125 | 9,6±1,2 10,2±0,8 | 11,0±1,0 11,1±0,4 | 6,6±0,6 6,8±0,7 | 8,0±1,0 8,3±0,3 | 9,6±0,6 9,4±0,6 | 4,6±0,3 5,3±0,7 | 34,0±0,6 35,3±0,8 |
| Заражение в лапки | | | | | | | |
| Музей- ный | 10,0±12 | 9,0±0,6 | - | 6,6±1,0 | 9,0±0,3 | - | 28,3±0,3 |
| 125 | 10,0±1,2 10,0±1,2 | 9,6±1,2 9,3±0,3 | - - | 6,0±1,5 6,3±0,3 | 8,0±1,0 8,5±0,3 | 4,3±0,3 1,2±2,1 | 31,0±1,2 31,8±3,5 |

Данные, приведенные в табл. 20 и 21, свидетельствуют, что более слабые по интенсивности и продолжительности кожные реакции наблюдаются у лабораторных животных на введение быстрорастущих микобактерий. Введение культур *M. smegmatis*, *M. diernhoferi*, *M. vaccae*, *M. flavescens* вызывают у кроликов и морских свинок на 3-5-й день развитие воспалительных инфильтратов, которые к 5-7-му дню достигают 8-12 мм без образования язв, а затем подвергаются обратному развитию. Через 12-15 дней реакций на месте введения этих микобактерий уже не отмечается. *M. fortuitum* у кроликов и свинок вызывают быстропроходящую воспалительную реакцию, характеризующуюся появлением через 4-6 дней после введения культуры небольших, неглубоких язвочек без отделяемого, у морских свинок 3-5 мм в диаметре, у кроликов – 7-6 мм, которые заживают к 12-15-му дню.

**Интенсивность и продолжительность местных реакций
при внутрикожном введении морским свинкам быстросрастущих
микобактерий ($M \pm m$), $n=3$**

| Штаммы бы- строрастущих микобактерий | Изменения в месте введения культуры (мм) после введения культуры через, дней | | | | | | Продол- житель- ность кожных реак- ций, дней |
|--|---|--------------------|--------|--------------------|--------------------|--------|--|
| | инфильтрат | | | язва | | | |
| | 7 | 15 | 20 | 7 | 15 | 20 | |
| <i>M. smegmatis</i> , музейный | 8,3±0,3 | - | - | - | - | - | 13,0±1,0 |
| <i>M. smegmatis</i> , шт. 129 | 9,0±0,6 | - | - | - | - | - | 13,6±1,2 |
| <i>M. vaccae</i> , музейный | 11,0±1,5 | - | - | - | - | - | 14,0±1,0 |
| <i>M. diernhoferi</i> , музейный | 11,0±1,2 | - | - | - | | - | 12,6±0,3 |
| <i>M. diernhoferi</i> , шт. 64 | 10,0±1,5 | - | - | - | - | - | 13,3±0,6 |
| <i>M. flavescens</i> , шт. 2 | 12,0±12,1 | - | - | | - | - | 12,0±0,6 |
| <i>M. fortuitum</i> , музейный | 11,0±0,6 | - | - | 4,3±0,3 | - | - | 14,6±0,3 |
| <i>M. fortuitum</i> , шт. 19 | 9,6±1,5 | 0 | 0 | 3,6±0,3 | 0 | 0 | 12,6±1,0 |
| <i>M. phlei</i> , музейный | 12,0±0,6 | 6,6±1,0 | 0 | 5,6±0,6 | 4,0±0,6 | 0 | 18,0±1,2 |
| <i>M. phlei</i> , шт. 10 | 11,6±1,0 10,5±0,4 | 9,9±1,2 8,3±1,7 | 0 0 | 7,0±1,0 5,1±0,8 | 6,0±0,6 5,0±0,8 | 0 0 | 19,6±0,3 13,3±0,8 |

Кислотоустойчивые палочки *M. phlei* у лабораторных животных обуславливают кожные реакции, почти идентичные по интенсивности с *M. fortuitum*, но более продолжительные. Заживление кожных дефектов происходит в течение 18-20 дней у свинок и в течение 23-25 дней у кроликов.

Полученные результаты показывают, что внутрикожное введение микобактерий туберкулеза бычьего вида морским свинкам и кроликам сопровождается появлением по-

Таблица 21

**Интенсивность и продолжительность местных реакций при
внутрикожном введении кроликам быстрорастущих
микобактерий ($M \pm m$), $n=3$**

| Штаммы быстро- растущих микобак- терий | Изменения в месте введения культуры (мм) после введения культуры через, дней | | | | | | Про- должи- тель- ность, кожных реак- ций, дней |
|--|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--|
| | инфильтрат | | | язва | | | |
| | 7 | 15 | 20 | 7 | 15 | 20 | |
| <i>M. smeg- matis</i> , музейный | 103,0±0,6 | - | - | - | - | - | 14,0±1,0 |
| <i>M. smeg- matis</i> , шт. 129 | 11,3±0,3 | 2,6±1,2 | - | - | - | - | 14,6±1,0 |
| <i>M. vaccae</i> , музейный | 93,0±1,5 | - | - | - | - | - | 12,3±1,0 |
| <i>M. diern- hoferi</i> , музейный | 11,3±0,6 | 4,3±1,0 | - | - | - | - | 14,0±0,6 |
| <i>M. diern- hoferi</i> , шт. 64 | 9,0±1,2 | - | - | - | - | - | 12,6±1,2 |
| <i>M. flaves- cens</i> , шт. 2 | 11,0±0,6 | 3,3±1,0 | - | - | - | - | 15,0±0,6 |
| <i>M. fortui- tum</i> , музейный | 11,6±0,3 | 4,6±1,0 | - | 8,0±0,6 | - | - | 13,3±1,0 |
| <i>M. fortui- tum</i> , шт. 19 | 11,0±0,1 | 4,3±1,2 | - | 7,3±1,2 | - | - | 14,6±0,3 |
| <i>M. phlei</i> , музейный | 12,3±0,3 | 9,0±0,6 | 8,0±0,3 | 8,3±1,0 | 5,3±1,2 | 4,6±0,3 | 23,3±1,2 |
| <i>M. phlei</i> , шт. 10 | 11,3±0,3 110,8±0,3 | 8,0±1,2 3,6±0,6 | 6,0±0,6 7,5±0,1 | 7,3±1,2 3,1±0,1 | 6,0±1,2 5,7±0,6 | 5,3±1,5 5,0±0,1 | 24,6±0,3 15,8±0,3 |

степенно увеличивающихся в размерах инфильтратов, в дальнейшем изъязвляющихся с образованием казеозных

масс, не заживающих до гибели животных. Введение же остальных видов микобактерий приводит к формированию кожных дефектов, подвергающихся более раннему или позднему угасанию или заживлению. Внутрικοжная проба на свинках и кроликах является достоверным и информативным методом дифференциации микобактерий бычьего вида от атипичных микобактерий, что позволяет рекомендовать ее для бактериологических лабораторий как более быстрый и экономичный критерий при определении видовой принадлежности культур микобактерий.

При вскрытии 16-19-дневных куриных эмбрионов, зараженных микобактериями туберкулеза бычьего вида, у одного из них на хорион-аллантоисной оболочке наблюдали специфические поражения, которые проявляются в виде желатинозного отека мезодермального слоя оболочки и массовых скоплений беловато-желтых узелков, рассеянных вдоль кровеносных сосудов. У остальных эмбрионов видимых изменений не отмечали.

Гистологическое исследование препаратов, приготовленных из хорион-аллантоисной оболочки эмбрионов, зараженных микобактериями бычьего вида, через 10 суток показало, что оболочка на значительном протяжении резко изменяется, в большей степени изменениям подвергается внутренний слой. Мезенхима отечна и разрыхлена, с дистрофическими изменениями, сосуды расширены, местами отмечаются гиперемия и кровоизлияния. В мезодермальном слое очаговая лейкоцитарная инфильтрация. Продуктивные процессы сопровождаются образованием гранулемоподобных бугорков, состоящих из лимфоидных, единичных эпителиоидных и гигантских клеток. В центре бугорков находятся клетки с признаками некроза, по периферии многочисленные макрофаги, эозинофилы и эпителиоидные клетки.

В эктодермальном слое располагаются значительные очаговые инфильтраты, состоящие из лимфоцитов и гистиоцитов. По периферии этого слоя отмечаются скопления эритроцитов в сосудах, что является признаком развивающейся гиперемии. Клетки эпителия ХАО больших изменений не имеют.

В печени и легких также обнаруживается повышенное содержание клеток лимфоидного ряда. Промежутки между печеночными пластинками слабо выражены.

При исследовании препаратов ХАО 19-дневных эмбрионов, зараженных микобактериями туберкулеза птичьего вида, наблюдали сильное расширение сосудистой сети ХАО. Рядом с кровеносными сосудами располагаются гистиоциты с большими ядрами. Макрофаги и единичные эпителиоидные клетки встречаются по всему мезодермальному и частично эктодермальному слою. В этом слое чаще, чем в мезодермальном, развиваются дистрофические процессы в клетках, эпителиальные клетки эктодермы подвергаются вакуольной дистрофии, а их цитоплазма — гидропическому набуханию. В некоторых случаях наблюдается частичное разрастание и омертвление эпителиальных клеток. Видимых изменений при заражении куриных эмбрионов микобактериями птичьего вида и другими атипичными микобактериями не обнаружили.

Обобщение результатов по заражению лабораторных животных различными видами микобактерий позволило сделать следующие выводы:

1) интратестикулярное введение микобактерий туберкулеза бычьего вида морским свинкам способствует более быстрому развитию генерализованного туберкулезного процесса в сравнении с подкожным, что подтверждается гибелью животных в более ранние сроки с наличием специфических поражений, идентичных таковым при введении этих же микобактерий под кожу;

2) интратестикулярное введение морским свинкам культур атипичных микобактерий (*M. avium*, *M. fortuitum*, *M. phlei*) позволяет выявить у них потенциальную патогенность, о чем свидетельствуют макро- и микроскопические изменения в органах и тканях животных;

3) интратестикулярное введение способствует более активной и более быстрой приживаемости микобактерий в организме, что проявляется в повышении интенсивности и скорости высеваемости культур из внутренних органов морских свинок;

4) внутрикожная проба на свинках и кроликах является достоверным критерием при дифференциации микобактерий туберкулеза бычьего вида от атипичных микобактерий II, III, IV групп по классификации Е.Н. Runyon, при этом наиболее экономичным признано использование морских свинок;

5) использование ХАО развивающегося куриного эмбриона в качестве биологической модели для дифференциации микобактерий требует дальнейшего изучения.

2.5. Идентификация микобактерий, изолированных из объектов внешней среды

Микобактерии, изолированные из объектов среды обитания животных и зверей в количестве 87 культур, были идентифицированы по схеме, разработанной ВИЭВ (Юдин, 1972). Результаты представлены в табл. 22.

Для более детальной идентификации отобрали 157 культур микобактерий, изолированных из объектов среды обитания животных 8 сельскохозяйственных и звероводческих предприятий. У выделенных культур изучали морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические и биологические свойства. Апробировано более 15 методик, которые используются как в нашей стране, так и за рубежом. Получены следующие результаты.

Культуральные свойства. На яичных средах микобактерии туберкулеза бычьего вида образовывали колонии гладкие (S-форма) и шероховатые (R-форма). Это были крошкоподобные мелкие либо крупные блестящие или матовые единичные колонии или их скопления.

Микобактерии, отнесенные к кислотоустойчивым сапрофитам, росли быстро, обычно на 2-5-й день, в виде мелких или средних размеров колоний, округлых, гладких, серовато-влажных и морщинистых с ярко выраженной оранжевой, желтой окраской или без нее.

Микобактерий второй группы по Е.Н. Runyon росли

несколько медленнее, чем микобактерии-сапрофиты (на 9-14-й день), окрашивались в ярко-оранжевые тона независимо от того, выращивались они на свету или в темноте. Эти микобактерии хорошо росли на яичных средах при 22°C и 37°C, но не давали роста при 45°C и 52°C, в то время как микобактерии-сапрофиты росли при 45°C, а *M. phlei* — при 52°C.

Микобактерии туберкулеза бычьего, птичьего видов с ослабленной вирулентностью и интрацеллюлярные не росли на мясопептонном агаре. Сапрофитные микобактерии хорошо росли на МПА, скотохромогенные — несколько медленнее. Следовательно, можно заключить, что способность к росту в широком диапазоне температурных границ является признаком, характерным для кислотоустойчивых сапрофитов, и может быть использована как дифференциальный тест.

Пигментообразование. *M. bovis*, *M. avium* и *M. intracellulerae* не образовывали пигмента ни в темноте, ни на свету. Желто-оранжевый пигмент был отмечен у двух штаммов *M. intracellulerae* в более поздние сроки выдерживания в термостате. У большинства сапрофитных и скотохромогенных микобактерий пигментообразование выявлено независимо от того, выращивались они на свету или в темноте. У 9 культур кислотоустойчивых сапрофитов, изолированных в сельскохозяйственном предприятии «Маяк», пигментация не выявлена.

Следовательно, пигментация не может считаться стойким признаком и не может быть в полной мере использована как дифференциальный тест.

Образование корд-фактора. У микобактерий бычьего вида, выращенных в среде Сотона с сывороткой, наблюдали образование кос, жгутов, правильно сформированных кучек; у сапрофитов, скотохромогенных, а также у *M. intracellulerae* строгого формирования клеток не установлено. Как правило, такие микобактерии были разбросаны беспорядочно.

Таблица 22

Характеристика кислотоустойчивых микобактерий

| Количество культур | Скорость роста из паттерса-на, дней | Характер колоний на яичных средах | Питментобразованье | Рост при | | Рост на МПА | Патогенность для | | | | Корд-фактор | Катализаная активность | Формиаланая активность | Обесцвечивание | | Группа микробактерий (вид) |
|---|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|----------|------|-------------|------------------|----------|-------|--------------|----------------|------------------------|------------------------|-----------------|----|----------------------------|
| | | | | 20°С | 45°С | | морских свинок | кроликов | норок | по Скрабиной | | | | серной кислотой | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | |
| Сельскохозяйственное предприятие | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 5-9 | Мелкие, желтовато-оранжевые | + | + | + | + | - | - | - | - | более + + + + | + + + + | + | + | + | Сапрофиты |
| 1 | 8-9 | Желтовато-оранжевые | + | + | + | + | - | - | - | - | + + + + | + + + + | ± | ± | ± | Атипичная |
| Сельскохозяйственное предприятие | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 11-12 | Гладкие, серовато-белые | - | - | + | - | - | + | + | + | 2-4 + | - | | | | Птичий |
| 3 | 48-50 | Круглые, влажные, прозрачные | - | - | - | - | + | + | + | + | 4-10 + + | - | | | | Бычий |
| 11 | 5-8 | Гладкие, желтовато-оранжевые | + | + | ± | + | - | - | | | до 100 + + + + | - | ± | ± | ± | Сапрофиты |
| Звероводческое сельскохозяйственное предприятие | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 33-34 | Гладкие, шаровидные | - | - | + | - | - | + | - | - | 2-4 + | - | - | - | - | Птичий |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|---|-------------------|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|----|----|---------------|----------|----|----|-------------------------------|
| 2 | 44-57 | Сухие, крошко-видные | - | - | - | - | + | + | + | + | 4-6 ++ | - | - | - | Бычий |
| 3 | 9-10 | Желтовато-оран-жевые | + | + | + | + | - | - | - | - | 100 +++ | +++ + | + | + | Сапрофиты |
| 3 | 25-26 | Гладкие, мелкие, зернистые | - | - | - | - | - | - | - | ± | - | - | - | - | С ослабленной вирулентно-стью |
| Сельскохозяйственное предприятие | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 16-17 | Мелкие, влажные сероватые | - | - | + | - | - | + | - | ± | 1-5++ | - | - | - | Птичий |
| 2 | 30-32 | Мелкие, сухие, шероховатые | - | - | - | - | + | + | - | + | 2-4+ | - | - | - | Бычий |
| 6 | 6-11 | желтовато-оран-жевые | ± | + | ± | + | - | + | - | - | до100 ++++ | ++++ | ± | ± | Сапрофиты |
| 1 | 10-12 влаж-ные | Влажные | + | + | + | + | - | - | - | - | 100 ++++ | - | + | + | Атипичная |
| Звероводческое сельскохозяйственное предприятие | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 14-15 | Округлые, серо-белые, влажные | - | - | + | - | - | + | - | + | 2-6 ++ | - | - | - | Птичий |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|------------------------------------|---|---|---|---|---|---|----|----|---------------------|------|----|----|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 3 | 39-43 | Мелкие, зернистые | - | - | - | - | + | + | - | + | 4-8 ++ | - | - | - | Бычий |
| 9 | 4-10 | Серовато- белые | - | ± | ± | + | - | - | - | - | 30-100 ++++ | ++++ | ± | ± | Сапрофиты |
| Звероводческое сельскохозяйственное предприятие | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 13-19 | Крупные серовато-влажные | - | - | + | - | - | + | - | + | 2-8 ++ | - | - | - | Сапрофиты |
| 6 | 4-6 | Серовато белые, влажные | ± | + | + | + | - | - | - | - | 50-100 ++++ | ++++ | + | + | Атипичные |
| Сельскохозяйственное предприятие | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | 3-12 | Слизистые, полушаровидные, гладкие | ± | + | + | + | - | - | - | - | более 30 ++++ | ++++ | ± | ± | Сапрофиты |
| 2 | 3-4 | Гладкие, полу-круглые | + | + | + | + | + | - | - | - | ++++ | - | - | - | Атипичные |
| Контроль | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | - | Влажные, желтовато-оранжевые | ± | + | + | + | - | - | - | - | ++++ | ++++ | + | + | Музейные штаммы <i>M. phlei</i> , <i>M. smegmatis</i> |

Каталазная активность. Микобактерии туберкулеза бычьего вида и *M. intracellulae* обладали слабовыраженной активностью, а при прогревании культур до 68°C в течение 30 мин каталазная активность у них исчезала. Сапрофитные и скотохромогенные микобактерии обладали различной каталазной активностью (табл. 23) и не теряли ее после прогревания.

В полуколичественном тесте высота каталазной активности достигла 100 мм и выше. У микобактерии туберкулеза с ослабленной вирулентностью каталазная активность не выявлена.

Формамидазная активность была отрицательной у патогенных культур *M. bovis*, *M. avium*. Культуры авирулентных микобактерий, за исключением 4 из 63 (6,3%), обладали положительной формамидазной активностью и были отнесены к кислотоустойчивым сапрофитам.

Формамидазная активность была отрицательной у патогенных культур и штаммов *M. intracellulae*. Микобактерии-сапрофиты, за исключением 5 культур *M. fortuitum*, обладали положительной формамидазной активностью. У двух культур, отнесенных к *M. phlei*, отмечена слабая формамидазная активность. У *M. intracellulae* формамидазная активность была отрицательной, а 3 культуры *M. gordonae* из 13 дали формамидазоположительную реакцию.

При анализе данных табл. 23, с учетом указанных тестов, 21 культуру микобактерий можно было бы определить как *M. gordonae* или как *M. scrofulaceum*.

По литературным данным известно, что *M. gordonae* гидролизует твин-80, в то время как *M. scrofulaceum* не способна к этой реакции. Учитывая этот и другие факты, мы изучили диагностическую ценность некоторых биохимических тестов (табл. 24).

Указанными тестами было изучено 157 культур микобактерий, изолированных нами в течение трех лет из объектов животноводческих помещений сельскохозяйственного предприятия «Покровский».

Таблица 23

Результаты дифференциации микобактерий, изолированных из объектов среды обитания животных
(первый этап)

| Число | Скорость роста в пересеве, дней | Рост на среде Петраньяни при температуре, °С | | | | Рост на МПА | Пигментация | Патогенность для | | | Каталазная активность | Формирующая активность | Корд-фактор | Обесцвечивание по Скрайбиной | Вид микобактерий |
|------------|---------------------------------|--|----|----|----|-------------|-------------|------------------|----------|-------------|-----------------------|------------------------|-------------|------------------------------|---|
| | | 22 | 37 | 45 | 52 | | | морских свинок | кроликов | кур | | | | | |
| 9 | 11-17 | + | + | + | - | - | + | - | - | - | Слабая +3,5 | - --- | - | - | <i>M. intracellulareae</i> |
| 50 | 2-6 | + | + | + | - | + | + | + | - | Не заражали | 30-100 + + + + | + | - | + - *** | <i>M. smegmatis</i> |
| 9 | 2-5 | + | + | + | + | + | + | - | - | То же | 30-90 + + + + | (±2) | - | + - | <i>M. phlei</i> |
| 28 | 15-25 | - | + | - | - | - | - | + | + | « | Слабая +3,5 | - | + | - | <i>M. bovis</i> |
| 30 | 2-7 | + | + | - | - | + | - | - | - | « | 30-35 + + | (+5) | - | - | <i>M. fortuitum</i> |
| 21 | 9-27 | + | + | - | - | + | + | Не заражали | - | - | 30-90 + + + | (±3) | - | - | <i>M. gordonae, M. scrofulaceum</i> не идентифицированы |
| Всего: 157 | | | | | | | | | | | | | | | |

* У двух культур отмечена желтовато-оранжевая окраска.

** Заражение лабораторных животных осуществлялось выборочно.

*** Часть культур обесцвечивалась жавелевой водой по методике Е.Л. Скрайбиной.

Как видно из табл. 24, для *M. bovis* характерна уреазная активность. Наибольшей активностью обладала культура *M. scrofulaceum*, которая разлагала мочевины, никотинамид и пиразинамид. Из 13 культур, определенных как *M. goodii*, 8 не разлагали мочевины и только 5 обладали уреазной активностью.

Для *M. intracellularea* характерна никотинамидазная и пиразинамидная активность. Быстрорастущие микобактерии были определены как *M. fortuitum*, *M. phlei* и *M. smegmatis*. Культуры *M. fortuitum* быстро и хорошо росли на среде Петраньяни, образуя гладкие серовато-белые, влажные круглые или шероховатые неокрашенные колонии. У 22 культур этих микобактерий установлена ацетамидазная, уреазная, аллантаиназная и формамидазная активность. У 3 культур отмечена слабая никотинамидазная активность и у 2 — пиразинамидазная.

Микобактерии, отнесенные к кислотоустойчивым сапрофитам, *M. phlei* и *M. smegmatis*, обладали более широким амидазным спектром. *M. phlei* ферментировали мочевины, никотинамид, пиразинамид и формамид. Однако, как мы уже указывали, у 2 культур из 6 отмечена слабая формамидазная активность. У 29 культур *M. smegmatis* выявлена ферментативная активность в отношении 7 амидов большого амидного ряда, за исключением малонамида. У 2 культур выявлена слабая ферментация салициламида.

Тест восстановления нитратов дал положительный результат у *M. fortuitum*, *M. phlei* и *M. smegmatis*. Остальные культуры дали отрицательную реакцию на редукцию нитратов.

Салициловый натрий в концентрации 0,1% оказывал губительное действие на микобактерии бычьего вида. Все другие давали хороший рост на среде Левенштейна-Йенсена с добавлением салицилового натрия. Этот тест позволяет отдифференцировать апатогенные кислотоустойчивые микобактерии от возбудителя туберкулеза бычьего вида.

При изучении устойчивости микобактерии к 5%-му хлориду натрия было установлено, что указанная концен-

Культурально-биохимическая характеристика, микобактерий, изолированных из объектов животноводческих помещений сельскохозяйственного предприятия «Покровский»(второй этап)

| Тесты | Виды микобактерий | | | | | | Не идентифицированы |
|---|-------------------|------------------------|------------------|--------------------------|---------------------|-----------------|---------------------------|
| | <i>M. bovis</i> | <i>M. scrofulaceum</i> | <i>M. goodii</i> | <i>M. intracellulare</i> | <i>M. fortuitum</i> | <i>M. phlei</i> | <i>M. smegmatis</i> |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Количество штаммов | 25(19,6%) | 8 (6,2%) | 13 (10,2%) | 7(5,5%) | 27 (21,3%) | 6 (4,4%) | 31 (24,5%) |
| Амидный ряд | 3 | 3, 5, 6 | 3 или 0 | 5, 6 | 1, 3, (5±), (6±), 8 | 3, 5, 6 | 1, 2, 3, 4, 5, 6, (7±), 9 |
| Редукция нитратов | - | - | - | - | + | + | + |
| Рост на среде Левенштейна-Йенсена с салициловым натрием | - | + | + | + | + | + | + |
| Формамидная активность | - | - | -3 | - | +22 | ± | + |
| Устойчивость к 0,5%-му хлористому натрию | - | - | - | - | + | + | + |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---|---|---|---|----------------|----------------|----------------|---|
| к 0,1%-й пикриновой кислоте | - | - | - | - | + | + | + | |
| к 0,2%-й пикриновой кислоте | - | - | - | - | - | - | - | |
| Рост на среде с NaNO_2 как единственным источником азота | - | - | - | - | Через 1 неделю | Через 3 недели | Через 3 недели | |
| Деградация салицилового натрия и ПАСК | - | - | - | - | Через 1 неделю | Через 3 недели | Через 3 недели | |
| Гидролиз твина - 80 | - | - | + | - | \pm | + | + | |

Примечание: 5(\pm) — отдельные культуры давали сомнительные или слабоположительные реакции.

трация соли задерживает рост на глицериновом бульоне *M. bovis* и скотохромогенных микобактерий. *M. fortuitum*, *M. smegmatis* и *M. phlei* в течение 2-3 недель образуют на указанной среде хорошо сформированную пышную пленку.

Использование нитрата как единственного источника азота проверяли на синтетической среде, содержащей азот только в виде нитрата натрия. Установлено, что *M. bovis* и скотохромогенные микобактерии не обладали способностью усваивать нитратный азот и расти на этой среде, в то время как *M. fortuitum* давали видимый рост в течение одной недели. К концу второй недели появлялся рост *M. smegmatis*, и только на третьей неделе культивирования отмечали очень скудный рост *M. phlei*. На контрольных средах без добавления NaNO_2 не установлено роста ни у одной из изучаемых культур.

Резистентность к пикриновой кислоте характерна для микобактерий четвертой группы по Е.Н. Runyon.

Деградация салицилового натрия в недельный срок была выявлена у 23 культур *M. fortuitum* и только 4 культуры не окрашивали среду в черный цвет. *M. smegmatis* и *M. phlei* также росли на средах, но среды при этом не окрашивались в черный цвет. Лишь через три недели примерно в 80% случаев наблюдали почернение среды. Аналогичные явления были отмечены и при изучении дегградации ПАСК.

Для оценки сахаролитической активности у изучаемых микобактерий были использованы пестрые ряды. Сахаролитическая активность была изучена у 117 культур микобактерий. Результаты этих наблюдений показаны в табл. 25, из которой можно заключить, что наиболее активными оказались микобактерии-сапрофиты *M. phlei*, *M. smegmatis*.

Обращает на себя внимание аураминная дисковая проба, с помощью которой, по данным отечественных и зарубежных ученых, можно легко и быстро дифференцировать вирулентные микобактерии (аураминположительные) от атипичных и сапрофитных кислотоустойчивых микобактерий (аураминнегативные).

По этой пробе мы проверили более 100 культур ми-

Таблица 25

Сахаролитическая активность микобактерий

| Виды микобактерий | Число штаммов | Моносахариды | | | | | | | | Дисахариды | | | Многоатомные спирты | | | |
|--------------------------|---------------|--------------|----------|---------|-----------|-----------|-----------|---------|-----------|------------|----------|---------|---------------------|--------|--------|---------|
| | | глюкоза | фруктоза | манноза | арабиноза | галактоза | раманноза | ксилоза | треталоза | сахароза | мальтоза | лактоза | сорбит | маннит | инозит | дульцит |
| <i>M. bovis</i> | 25 | ± | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>M. scrofulaceum</i> | 8 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>M. goodiae</i> | 13 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>M. intracellulare</i> | 7 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>M. fortuitum</i> | 27 | + | + | + | - | - | - | - | 18+ | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>M. phlei</i> | 6 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - |
| <i>M. smegmatis</i> | 31 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | 28+ |
| Контроль | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>M. avium</i> | 1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>M.bovis</i> | 1 | ± | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>M. smegmatis</i> | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| <i>M. phlei</i> | 1 | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | + | - | - |

Примечание. «±» – реакция сомнительная (окраска среды с коричневым оттенком)

кобактерий, изолированных с объектов среды обитания животных. Полученные результаты позволяют сделать заключение о высокой диагностической ценности аураминовой дисковой пробы. Следует лишь указать, что микобактерии, определенные нами по другим тестам как *M. intracellulareae*, в большинстве случаев были аураминположительными. Следовательно, аураминовую дисковую пробу можно использовать для дифференциации патогенных микобактерии от непатогенных как дополнительный метод.

Биопроба. У 151 кролика и 151 морской свинки, зараженных патогенными микобактериями, изолированными в хозяйствах (см. табл. 22), на секции выявлены характерные туберкулезные изменения. У животных, в том числе у четырех норок, зараженных кислотоустойчивыми сапрофитами и атипичными микобактериями, отмечены хорошее развитие, прибавка в массе, а после убоя на месте инъекции культур ни у одного животного не было найдено никаких поражений. Лимфатические узлы, селезенка, сальник, печень, почки, легкие, сердце были стерильны в отношении микобактерий как при окраске мазков-отпечатков, так и при посевах на яичные среды.

Устойчивость к лекарственным препаратам (ПАСК, фтиазид, тубазид, стрептомицин) у выделенных культур не определяли, поскольку были получены четкие результаты биологической пробы.

Для подтверждения видовой принадлежности микобактерий у 19 культур, изолированных с объектов животноводческих помещений, а также у 25 культур из объектов внешней среды сельскохозяйственного предприятия «Блюдчанский» изучены патогенные свойства. У 28 кроликов и 28 морских свинок выявлены характерные туберкулезные изменения (узелковая форма). У животных, зараженных, по предварительным данным, микобактериями-сапрофитами, отмечены хорошее развитие, прибавка в массе, а после убоя ни у одного животного не было найдено никаких поражений. Лимфатические узлы, селезенка, сальник, печень,

почки, легкие, сердце были стерильными в отношении микобактерий как при окраске мазков-отпечатков, так и при посеве на яичные среды.

У двух кроликов, зараженных микобактериями, отнесенными к третьей группе по Е.Н. Runyon, отмечено увеличение селезенки, а у морской свинки — незначительное увеличение регионарных паховых лимфатических узлов. В мазках-отпечатках из места введения и селезенки найдены единичные кислотоустойчивые палочки.

С эпизоотологической точки зрения представляет интерес характеристика объектов и микобактерий, изолированных с них. Фрагмент этих сведений представлен в табл. 26.

При индикации микобактерий туберкулеза из некоторых объектов птичников, неблагополучных по туберкулезу, нами было выделено 37 культур возбудителя туберкулеза. Из них у 16 культур изучили морфологические, культуральные и биологические свойства, а также их способность к росту при температуре 38°C и 42°C.

Мазки, приготовленные из 25-75-дневных культур, подвергали микроскопии, при этом их окрашивали не только по Цилю-Нильсену, но и по Граму и Вейксельбауму. В мазках из 25-дневных культур, окрашенных по Цилю-Нильсену, микобактерии туберкулеза представлялись в виде маленьких, иногда изогнутых палочек, равномерно окрашенных в рубиново-красный цвет. В мазках культур, впоследствии отнесенных к бычьему виду, микобактерии были несколько короче и толще, чем в мазках, приготовленных из культур птичьего вида. В мазках, окрашенных по Граму, микобактерии туберкулеза были темно-фиолетового цвета, а по Вейксельбауму — красного.

При микроскопии мазков, приготовленных из 75-дневных культур, наблюдали выраженный полиморфизм микобактерий туберкулеза. В мазках находили мелкие точечные формы в виде кокков, коротенькие и длинные палочки, некоторые из них имели булабовидные утолщения с неравномерной окраской отдельных участков. Их расположение

Таблица 26

Характеристика объектов и изолированных с них микобактерий

| Объекты | Виды микобактерий | | | | | | |
|----------------------|-------------------|------------------------|------------------|--------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| | <i>M. bovis</i> | <i>M. scrofulaceum</i> | <i>M. goodii</i> | <i>M. intracellulare</i> | <i>M. fortuitum</i> | <i>M. phlei</i> | <i>M. smegmatis</i> |
| «Маяк» | | | | | | | |
| Пол стойла | 2 | - | - | - | - | - | 1 |
| Кормушки | 1 | - | - | - | 1 | - | 3 |
| Стены | - | - | - | - | - | - | - |
| Центральный проход | - | - | - | - | - | 1 | - |
| Навозный проход | - | - | - | 1 | 2 | - | - |
| Итого | 3 | - | - | 1 | 3 | 1 | 4 |
| «Таганский» | | | | | | | |
| Пол стойла | - | - | - | - | - | - | - |
| Кормушки | - | - | - | - | - | 2 | 4 |
| Стены | - | - | - | - | - | - | 1 |
| Центральный проход | - | - | - | 1 | - | - | 3 |
| Навозный проход | - | - | - | - | - | - | 4 |
| Итого | - | - | - | 1 | - | 2 | 12 |
| «Отреченский» | | | | | | | |
| Пол стойла | 9 | - | 5 | 2 | 11 | - | 8 |
| Кормушки | 8 | 4 | 4 | 3 | 10 | 1 | 13 |
| Центральный проход | 2 | 1 | 2 | - | 1 | - | 5 |
| Навозный проход | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 |
| Навозная канава | 3 | - | - | 1 | 2 | 1 | 4 |
| Стены | - | 1 | - | - | - | 1 | - |
| Итого | 25 | 8 | 13 | 7 | 27 | 6 | 31 |
| Всего | 28 | 8 | 13 | 9 | 30 | 6 | 47 |

было разнообразным: в виде одиночных палочек, под углом или в виде кучек.

В процессе приготовления мазков было отмечено, что из 16 культур 13 хорошо растирались на предметных стеклах, а 3 — плохо. Культуральные свойства изучали на сре-

Таблица 27

**Культуральные свойства микобактерий туберкулеза, выделенных
из объектов внешней среды**

| Среда Петраньяни | Номера культур | Среда Павловского | Номера культур | МППБ | Номера культур |
|---|---------------------------|---|---|--|----------------------|
| Суховатый налет с жел- то-оранже- вым пигмен- том и слабо выраженной зернистостью | 2, 9, 4 | Обильный извилистый беловато- сероватый налет | 15, 12, 8, 14, 9, 10, 5, 4, 1, 3, 2 | Бульон прозрачен, на дне оса- док в виде сеточки или зонтика | 14, 12, 10, 5 |
| Суховатый морщини- стый налет с круглыми пуговице- образными колониями | 3, 7, 8 | Сухой налет серовато-бе- лого цвета | 6 | Бульон про- зрачен, на поверхности островки пленок, соприка- сающиеся между собой | 16, 13 |
| Влажный слизистый серовато- желтоватый налет | 1, 5, 6, 10, 14, 12 | Крупинча- тые колонии, возвышаю- щиеся над средой | 7 | Сухая пленка | 11 |
| Колонии сухие, ше- роховатые, напоминают сухой творог | 11, 13, 16 | Чешуйчатый налет в виде маленьких бородавок | 11, 13, 16 | Бульон про- зрачен, на поверхности его слизи- стая пленка, на дне осад- ки в виде сетки | 2, 3, 15, 7, 9, 4 |
| Отдельные округлые ко- лонии с углу- блениями бледно-серо- го цвета | 15 | - | - | Бульон про- зрачен, на дне хло- пьевидный осадок | 6 |

де Петраньяни, картофельной среде Павловского и МППБ. Данные по характеристике культуральных свойств тубер-

кулезных культур представлены в табл. 27, из которой видно, что микобактерии туберкулеза, выделенные из объектов внешней среды, неодинаково растут на питательных средах.

При изучении культуральных свойств микобактерий туберкулеза из всех 16 культур производили посевы на среде Петраньяни и выдерживали их при температуре 38°C и 42°C. В этом опыте выявляли и способность роста культур. При изучении культуральных свойств микобактерий туберкулеза из всех 16 культур производили посевы на среду Петраньяни и выдерживали их при температуре 38°C и 42°C. В этом опыте выявляли и способность культур к росту в определенных границах температурного режима. Так, при температуре 38°C 14 культур дали первые признаки роста на среде Петраньяни в течение 6-9 дней, а при температуре 42°C – в течение 5-8 дней. В то же время 3 культуры при температуре 38°C давали первые признаки роста на 12-18-й день, а при температуре 42°C даже при 39-дневном инкубировании роста не было установлено. Эти же культуры с трудом эмульгировались в момент приготовления микробной суспензии. Результаты наших исследований согласуются с данными других исследователей, которые при изучении культуральных свойств микобактерий туберкулеза различных видов указывали, что признак роста в широком диапазоне температурных границ является характерным для птичьего вида, тогда как культуры бычьего и человеческого видов совсем не растут при температуре 42-43 °C. По морфологическим, культуральным свойствам, а также по способности к росту на среде Петраньяни в определенных границах температурного режима культуры №1-10, 12, 14, 15 могут быть отнесены к птичьему виду, а культуры 11, 13 и 16 – к бычьему.

Для подтверждения принадлежности выделенных культур к тому или другому виду были заражены кролики и морские свинки. Культуры 3, 8, 9 дополнительно были проверены на петушках. Каждой культурой заражали двух кроликов массой 1,4-1,7 кг в возрасте 2-2,5 мес и двух морских свинок массой от 300 до 385 г.

Кроликов и морских свинок перед заражением подвергали аллергическому исследованию птичьим и бычьим туберкулинами, которые вводили внутрикожно двукратно в дозе по 0,1 мл. Учет реакции проводили через 48 ч в после первого введения туберкулинов и через 24 ч после второго введения.

Заражение морских свинок производили подкожно в области левого паха, кроликов и кур — внутривенно в дозе по 1 мг сырой микробной массы в 1 мл жидкости. Зараженные животные содержались в общем помещении, но в отдельных клетках по 2 животных в каждой. Наблюдения за животными велись в течение 5-6 месяцев с момента заражения. Животных вскрывали в день гибели или убоя. При этом обнаруживали наличие или отсутствие туберкулезных изменений в паренхиматозных органах, делали мазки-отпечатки из печени, селезенки, почек, сердца, легких, гастральных или брыжеечных лимфатических узлов. У морских свинок помимо указанных органов для приготовления мазков-отпечатков использовали материал из места введения штамма, при надобности — из паховых лимфатических узлов. Из селезенки и печени производили посевы на среду Петраньяни. Данные патолого-анатомических исследований кроликов и морских свинок, зараженных микобактериями туберкулеза, выделенными из объектов внешней среды, иллюстрируются табл. 28-30.

Исходя из данных патолого-анатомических исследований, представленных в таблицах, можно заключить, что культуры, выделенные из объектов внешней среды, явились патогенными для кроликов, в то время как морские свинки, за исключением шести голов, туберкулезом не заболели. Культуры 1-10, 12, 14 и 15 оказались весьма вирулентными для кроликов. При внутривенном введении этих культур кроликам смерть их наступала через 16-27 дней. На секции ни в одном случае не обнаружили туберкулезных очагов, однако в мазках-отпечатках, приготовленных из печени, селезенки и других органов, было найдено множество микобактерий

туберкулеза. Характерным признаком на вскрытии для всех кроликов, инфицированных вышеуказанными культурами, было увеличение селезенки в 1,5-2 раза. У морских свинок эти культуры каких-либо патологических изменений, за исключением местного процесса в местах введения, не вызывали.

У 6 кроликов, зараженных культурами 11, 13, 16, на секции обнаружили генерализованный туберкулез с бугорковыми поражениями в селезенке, легких, печени, других органах. Кролики при таком течении инфекции погибали в течение 49-64 дней. При микроскопии мазков-отпечатков, приготовленных из паренхиматозных органов этих кроликов, обнаруживали большое количество полиморфных палочек, хорошо окрашивающихся по Цилю-Нильсену. Для морских свинок эти культуры также оказались вирулентными. При патолого-анатомическом исследовании таких свинок (6 голов) устанавливали генерализованный туберкулез с наличием бугорков в печени, селезенке и легких. Морские свинки в этом случае погибали в течение 41-59 дней с момента заражения.

Таблица 28

Результаты заражения кроликов микобактериями туберкулеза

| Номер культуры | Количество кроликов | | Срок гибели, дней | Форма процесса | Вид возбудителя |
|----------------|---------------------|--------|-------------------|---------------------------|-----------------|
| | зараженных | павших | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 9 | 2 | 2 | 16-18 | Септическая (тип Йерсена) | Птичий |
| 10 | 2 | 2 | 18-20 | | |
| 5 | 2 | 2 | 18-21 | | |
| 14 | 2 | 2 | 19-23 | | |
| 7 | 2 | 2 | 19-21 | | |
| 15 | 2 | 2 | 20-20 | | |
| 8 | 2 | 2 | 20-24 | | |
| 3 | 2 | 2 | 20-26 | | |
| 6 | 2 | 2 | 21-23 | | |
| 1 | 2 | 2 | 22-23 | | |
| 2 | 2 | 2 | 23-23 | | |
| 4 | 2 | 2 | 23-25 | | |
| 12 | 2 | 2 | 24-27 | | |

Окончание табл. 28

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------|----|----|-------|----------------------------------|-------|
| 11 | 2 | 2 | 49-50 | Узелковая (тип Вил- лемен) | Бычий |
| 16 | 2 | 2 | 53-55 | | |
| 13 | 2 | 2 | 53-64 | | |
| Всего | 32 | 32 | - | - | - |

Таблица 29

**Результаты заражения морских свинок микобактериями
туберкулеза**

| Штамм | Кол-во морских свинок | Пали | | Срок, дней | | Убиты на какой день | | Степень поражения* | |
|-------|-----------------------------|-----------------|---|------------|----|------------------------|-----|-----------------------|---|
| | | Номер животного | | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 1 | 2 | - | - | - | - | 182 | 182 | 3 | 3 |
| 2 | 2 | 1 | - | 5 | - | - | 182 | 4 | 2 |
| 3 | 2 | 1 | - | 26 | - | - | 182 | 4 | 3 |
| 4 | 2 | - | - | - | - | 182 | 182 | 3 | 2 |
| 5 | 2 | - | - | - | - | 182 | 182 | 2 | 2 |
| 6 | 2 | - | - | - | - | 182 | 183 | 3 | 2 |
| 7 | 2 | - | - | | - | 183 | 183 | 2 | 3 |
| 8 | 2 | - | - | - | - | 165 | 165 | 2 | 2 |
| 9 | 2 | - | - | - | - | 165 | 174 | 2 | 3 |
| 10 | 2 | - | - | - | - | 174 | 174 | 3 | 3 |
| 11 | 2 | 1 | 1 | 57 | 59 | - | - | 1 | 1 |
| 12 | 2 | - | - | - | - | 174 | 174 | 3 | 3 |
| 13 | 2 | 1 | 1 | 41 | 49 | - | - | 1 | 1 |
| 14 | 2 | - | - | - | - | 173 | 173 | 3 | 3 |
| 15 | 2 | - | - | - | - | 173 | 173 | 3 | 3 |
| 16 | 2 | 1 | 1 | 50 | 57 | - | - | 1 | 1 |
| Всего | 32 | 5 | 3 | | | | | | |

*1 – генерализованный туберкулез (узелковая форма);

2 – гнойники на месте введения культуры;

3 – отсутствие изменений;

4 – другие заболевания.

**Характеристика течения заболевания у морских свинок,
зараженных микобактериями туберкулеза**

| Степень поражения | Пали | Убиты | Номера культур |
|-------------------|------|-------|----------------------------------|
| 1 | 6 | - | 11, 13, 16 |
| 2 | - | 9 | 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 |
| 3 | - | 15 | 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 15 |
| 4 | 2 | - | 2, 3 |
| Итого | 8 | 24 | |

Две морские свинки, зараженные культурами 2 и 3, погибли по причинам, не имеющим отношения к туберкулезной инфекции. У первой установлен перитонит, у другой — бронхопневмония и воспаление перикарда. Остальные 24 морские свинки были убиты. При патолого-анатомических исследованиях убитых морских свинок нам не удалось установить каких-либо патологических изменений, свойственных туберкулезу, за исключением наличия гнойников у 9 свинок в местах введения культуры величиной с лесной орех. При микроскопии мазков-отпечатков из места введения туберкулезной культуры находили единичные туберкулезные палочки. При посевах материала из печени и селезенки, произведенных на среду Петраньяни, а также из мест инъекций культуры не было получено.

При микроскопическом исследовании мазков-отпечатков, приготовленных из паренхиматозных органов кроликов и морских свинок, зараженных исследуемыми культурами, для регистрации результатов мы воспользовались схемой, суть которой сводится к следующему:

- редкие палочки «+»;
- умеренное количество микобактерий «++»;
- обильное количество микобактерий «+++»;
- чрезвычайно много палочек «++++».

Результаты исследований показаны в табл. 31.

Как видно из этой таблицы, микобактерии туберкулеза в больших количествах обнаруживались в печени и в

селезенке. В мазках-отпечатках, приготовленных из сердца, легких и почек, микобактерий туберкулеза встречалось несколько меньше, а иногда они совсем не обнаруживались. При посеве материала из печени и селезенки на среду Петраньяни во всех случаях наблюдали рост микобактерий туберкулеза.

Как указывалось выше, культуры 3, 8, 9 были дополнительно проверены на петушках 7-месячного возраста, которые погибли в течение 33-50 дней с начала заражения. При вскрытии петушков обнаруживались характерные для туберкулеза изменения — печень, селезенка, почки были пронизаны мелкими бледно-серыми узелками величиной с просяное зернышко, которые легко размазывались на предметном стекле. В печени узелков было значительно больше, чем в селезенке или почках. При микроскопии мазков-отпечатков, приготовленных из указанных органов, находили значительное количество микобактерий, отчетливо выделяющихся на голубом фоне мазка. В результате комплексного изучения морфологических, тинкториальных, культуральных, патогенных свойств, а также учета способности культур расти в определенных границах температурного режима 13 культур оказались птичьего вида и 3 — бычьего.

Таблица 31

Результаты микроскопии мазков-отпечатков из органов кроликов, зараженных микобактериями туберкулеза

| Номер культуры | Печень | Селезенка | Лимфоузлы | Сердце | Легкие | Почки |
|----------------|--------|-----------|-----------|--------|--------|-------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1 | ++++ | ++++ | ++ | + | ++ | ++ |
| 2 | ++++ | ++++ | ++ | + | + | + |
| 3 | ++++ | ++++ | + | + | — | + |
| 4 | ++++ | ++++ | +++ | + | + | + |
| 5 | ++++ | ++++ | - | - | - | + |
| 6 | ++++ | ++++ | ++ | + | + | + |
| 7 | ++++ | ++++ | + | + | ++ | ++ |
| 8 | ++++ | ++++ | ++ | - | + | - |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----|------|------|-----|----|------|----|
| 9 | ++++ | +++ | + | + | - | + |
| 10 | ++++ | ++++ | + | - | + | + |
| 11 | ++++ | ++++ | +++ | + | +++ | ++ |
| 12 | ++++ | ++++ | + | - | + | - |
| 13 | ++++ | ++++ | +++ | + | ++++ | ++ |
| 14 | ++++ | ++++ | + | - | + | - |
| 15 | ++++ | ++++ | + | + | + | + |
| 16 | ++++ | ++++ | ++ | ++ | ++ | + |

При выполнении работы по взятию материала с целью выяснения степени обсемененности различных объектов птичников возбудителем туберкулеза на одной из птицеферм нами был пойман ястреб-тетеревятник. При бактериологическом исследовании из печени его была выделена культура микобактерий (№ 17). Рост микобактерий туберкулеза на среде Петраньяни был обнаружен через 27 дней в виде влажных колоний с темноватым оттенком. В мазках из них найдена масса кислотоустойчивых палочек разных размеров, расположенных поодиночке и кучками, с выраженной зернистостью. На мясопептонном глицериновом бульоне культура покрывала дно колбы в виде легкоразбивающейся сеточки, хорошо эмульгировалась и размазывалась по стенке колбы, бульон был прозрачным. На среде Павловского выросли беловато-серые колонии, покрывающие влажным налетом всю поверхность картофельного клина. При заражении двух кроликов и двух морских свинок с целью типизации выделенного штамма по методу Аликаевой культура оказалась патогенной для кроликов: первый кролик погиб через 17 дней, второй — через 21. Морские свинки оставались живыми на протяжении пяти месяцев, а затем были убиты. При вскрытии у них найдены гнойники в месте введения культуры. На основании комплексного изучения морфологических, культуральных свойств и учета патогенности для кроликов выделенный штамм от ястреба-

тетеревятника оказался птичьего вида. Этот факт говорит о том, что дикие птицы инфицированы возбудителем туберкулеза и могут рассматриваться как источник возбудителя туберкулеза домашних птиц и свиней.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подчеркнем еще раз тот факт, что в эпидемиологии и эпизоотологии туберкулеза проблема видов микобактерий имеет не только теоретическое, но и большое практическое значение, так как создает основу для успешного проведения комплекса противотуберкулезных мероприятий. Определение видовой принадлежности изолированных культур микобактерий позволяет более точно выявить ареал их распространения, источники инфицирования человека, животных, птиц.

В настоящее время при исследовании патологического материала, молока, кормов, воды, почвы, объектов среды обитания животных резко возросла выявляемость атипичных микобактерий, которые требуют тщательной идентификации. В этом вопросе встречается немало затруднений. Строгой классификации атипичных микобактерий до сих пор не существует, имеющиеся методики и схемы, включающие набор тестов идентификации различных микобактерий, к сожалению, не всегда дают правильные результаты. Следовательно, необходим дальнейший поиск, апробация методик идентификации микобактерий и их практическая оценка.

В своей работе мы использовали бактериологические и биохимические методы идентификации микобактерий и некоторые дополнительные тесты. Микроскопическое изучение проводили при помощи светового и люминесцентного микроскопов по общеизвестным методикам. Культивирование микобактерий осуществляли главным образом на средах Левенштейна-Йенсена, Петраньяни, а также на выскослойном агаре по методу Лебека, простых питательных средах МПА, МПБ, среде Сотона.

У выделенных культур изучали:

- скорость роста субкультур при 22, 37, 45 и 52°C;
- характер роста колоний;
- величину, форму, поверхность, консистенцию колоний;
- тинкториальные свойства;
- способность к пигментообразованию на свету и в темноте;
- каталазную, формамидазную, пероксидазную и амидазную активность;
- деградацию (разрушение) натрия салицилата, ЛАСК;
- лекарственную чувствительность к стрептомицину, изониазиду, ПАСК методом абсолютных концентраций на плотных средах;
- редукцию (восстановление) нитратов;
- использование нитрата как единственного источника азота;
- гидролиз твина-80;
- устойчивость к хлориду натрия, к пикриновой кислоте, сахаралитическую активность.

В качестве дополнительных методов использовали методику Е.Л. Скрябиной (1955), а также аураминовою дисковую пробу в модификации В.М. Карташовой (1973).

Биопроба выполнена на лабораторных животных: кроликах, морских свинках, курах.

Выделенные работниками городского противотуберкулезного диспансера Омска 43 культуры микобактерий от больных туберкулезом людей мы идентифицировали как *M. tuberculosis*. Из них 8 культур получены от людей, проживающих в сельской местности и осуществляющих уход за животными.

К обслуживанию животных допускается персонал, прошедший медицинское обследование. Однако есть немало хозяйств, где это правило игнорируется. Так, на одной из ферм через два года после оздоровления была убита положительно реагирующая на туберкулин корова, из органов

которой сотрудники областной ветеринарной лаборатории изолировали культуру микобактерий туберкулеза человеческого вида. При обследовании обслуживающего персонала был выявлен больной туберкулезом. Пресечение подобных фактов возможно лишь при настойчивых совместных действиях медицинских и ветеринарных работников. Экономическая эффективность медико-ветеринарных мероприятий по профилактике туберкулеза была бы значительно выше, если бы руководители сельскохозяйственных предприятий могли организовать своевременную изоляцию и убой больных туберкулезом животных, строительство ветеринарно-санитарных объектов (убойных пунктов, пастеризационных и т.п.), улучшить ветеринарное снабжение, быт и условия работы животноводов.

В хозяйствах с массовым выявлением реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота исследовано 108 проб патологического материала, из которого изолировано 22 культуры микобактерий, из них 16 (72,7%) бычьего вида, 6 (27,3%) отнесены к четвертой группе атипичных микобактерий.

Результаты исследований лекарственной резистентности микобактерий, выделенных от животных, показали, что микобактерии бычьего вида обладали высокой вирулентностью и чувствительностью ко всем изучаемым препаратам. В то же время атипичные микобактерии являлись резистентными к стрептомицину, изониазиду и ПАСК.

Изучение лекарственной резистентности микобактерий, выделенных от людей, показало, что из 29 штаммов устойчивыми к стрептомицину были 2 (9,1%), к изониазиду и ПАСК — 4 (18,2%). Устойчивость к 2 препаратам отмечена у двух (9,1%) культур. Установлено, что каталазная активность была снижена у микобактерий, чувствительных к изониазиду.

В течение 10 лет мы вели работу по индикации микобактерий из объектов внешней среды обитания животных в хозяйствах, неблагополучных по туберкулезу. Бактериоло-

гическому исследованию подвергнуто более 2000 проб (соскобы или смывы со стен, полов, столбов, кормушек, кормопроходов и т.п.), при этом выделено 244 культуры микобактерий. Анализ видового спектра изученных микобактерий показал, что в него вошли *M. bovis* (19,6%), *M. avium*, *M. intracellulareae* (5,5%), *M. gordonae* (10,2%), *M. vaccae* (1,8%), *M. fortuitum* (21,3%), *M. smegmatis* (24,5%), *M. phlei* (4,4%), *M. scrofulaceum* (6,2%) и ряд других (6%) микобактерий, видовую принадлежность которых мы не смогли установить.

Полученные нами данные свидетельствуют, что проблема ликвидации туберкулеза не может быть полностью решена без учета роли объектов среды обитания животных. Сколько бы раз мы не сменяли больное поголовье, при неудовлетворительно проводимых ветеринарно-санитарных мероприятиях на фермах очаги туберкулеза остаются неликвидированными, и поступающие на эти фермы здоровые животные рано или поздно заражаются туберкулезом.

В настоящее время не только в медицине, но и в ветеринарии актуальна проблема атипичных микобактерий, населяющих как макроорганизмы, так и внешнюю среду. Способность этих микобактерий сенсibilизировать организм к туберкулинам и вызывать патолого-анатомические изменения, напоминающие туберкулез, значительно осложняет работу по оздоровлению животных. По нашим данным, у 25% животных, реагирующих на туберкулин, при отсутствии туберкулезных поражений выделяются атипичные микобактерии. Поэтому нельзя полагать, что оздоровление будет достигнуто только с помощью аллергического метода исследования. Параллельно с этим необходимо проводить обязательные бактериологические, гистологические исследования с последующей идентификацией выделенных культур. Однако в этом вопросе имеется немало трудностей. Известен опыт коллективного изучения закодированных культур микобактерий, проведенного в социалистических странах, во время которого не удалось провести полную идентификацию микобактерий, и совпадение результатов исследований составило 80-90 %.

Хотелось бы высказать ряд соображений о диагностической ценности отдельных тестов, использованных в нашей работе. Некоторые авторы указывают, что по различному оттенку свечения можно дифференцировать истинные микобактерии от атипичных. Другие (в том числе и мы) считают, что ни световая, ни люминесцентная микроскопия на данном этапе не решает вопроса прямой дифференциации патогенных микобактерий от атипичных. Если бы удалось разработать методику дифференциации микобактерий непосредственно в мазках, это явилось бы большим достижением в бактериологической диагностике туберкулеза.

Мы часто использовали формамидазный тест и пришли к заключению, что часть атипичных микобактерий не обладает положительной формамидазной активностью и содержится только в кислотоустойчивых сапрофитах по классификации Е.Н. Runyon (четвертая группа микобактерий). М.М. Дыхно и др. (1964) обнаружили формамидазу в 8 культурах атипичных микобактерий. М.П. Зыков (1976) получил положительные результаты при проведении формамидазного теста у 5,5% изученных им 229 представителей атипичных микобактерий, изолированных в Африке. По данным В.С. Тыриной (1968), среди кислотоустойчивых сапрофитов имеются штаммы, не обладающие формамидазной активностью.

Противоречивость в оценке формамидазного теста при идентификации атипичных микобактерий затрудняет сравнение данных, полученных разными исследователями.

С нашей точки зрения, целесообразна совместная работа ветеринарных и медицинских лабораторий, имеющих опыт идентификации микобактерий по оценке формамидазного теста. Использование этого теста (даже при учете его относительной ценности) в комплексе с другими дает возможность сделать предварительное заключение о природе изучаемого штамма, не прибегая к биопробе.

В целом же использованный нами комплекс основных и дополнительных лабораторных тестов, предложенный от-

ечественными и зарубежными авторами, позволяет отличить возбудителя туберкулеза бычьего вида от атипичных микобактерий.

Данные, полученные нами, могут быть использованы для теоретического обобщения и объяснения роли атипичных микобактерий в эпизоотологии туберкулеза животных. Считаем, что в условиях эпидемиологического и эпизоотологического неблагополучия по туберкулезу изучение микобактерий, циркулирующих на объектах среды обитания животных, приобретает большое значение.

Анализ отечественных и зарубежных литературных данных свидетельствует, что интерес к атипичным микобактериям является вполне оправданным, так как некоторые из них способны не только сенсибилизировать организм животных и человека к туберкулинам, что существенно затрудняет диагностику туберкулеза, но и вызывать развитие патологических процессов в организме (Юдин, 1972, 1986, 1987; Мартма, 1971, 1974, 1982, 1986; Макаревич, 1973; Вейсфайлер, 1975; Лазовская, Блохина, 1976; Зыков, Ильина, 1978; Кадочкин, 1979, 1984; Благодарный, 1980; Харитонов, Сафин, 1982; Харитонов, 1983, 1985; Мартма, Тяхнас, 1986, 1988; Pavlas, 1965; Tsukamura, 1977, 1988; Corner, Pearson, 1978; Димов, 1985; Grange, 1986; Grande, Yater, 1986; Collins et al., 1986; Schultre, Brasso, 1987; Portaels, 1988 и др.).

Следует отметить, что, если в медицинской практике накоплено достаточно информации о свойствах атипичных микобактерий, их роли в этиологии и патологии, то ветеринарная практика находится на стадии накопления этих данных.

В связи с этим в лаборатории специфической профилактики туберкулеза ВНИИ бруцеллеза и туберкулеза животных под руководством доктора ветеринарных наук, профессора Б.Я. Хайкина проводились исследования по изучению культур микобактерий, выделенных от крупного рогатого скота, реагировавшего на туберкулин для молокопитающих в хозяйствах с различной эпизоотической ситуацией по туберкулезу. При этом основное внимание было

обращено на идентификацию культур по культурально-морфологическим, биохимическим, биологическим свойствам, на их сенсibiliзирующие и патогенные свойства, а также на определение их устойчивости к воздействию температурных и химических факторов.

Результаты определения видового состава микобактерий, циркулирующих среди крупного рогатого скота, реагирующего на туберкулин в хозяйствах Новосибирской области с различной эпизоотической ситуацией по туберкулезу, показали, что в сельскохозяйственных предприятиях, где неблагополучие подтверждено патолого-анатомическими и бактериологическими исследованиями от животных, реагирующих на туберкулин, было выделено 29,3% культур микобактерий, из которых 5,6 — бычьего вида и 23,7% культур — представители атипичных микобактерий II, III и IV групп по классификации Е.Н. Runyon. При бактериологическом исследовании проб молока и смывов с молочного оборудования получено 7,5% культур атипичных микобактерий, идентифицированных как *M. vaccae*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. phlei*, *M. diernhoferi*.

В благополучных по туберкулезу хозяйствах при патолого-анатомическом и бактериологическом исследовании биоматериала от животных, убитых с диагностической целью, изолировали 23,7% культур, дифференцированных как микобактерии II, III и IV групп по Е.Н. Runyon. При бактериологическом исследовании проб молока и смывов с молочного оборудования выделили 12,5% культур атипичных микобактерий, принадлежащих к IV группе по классификации Е.Н. Runyon: *M. diernhoferi*, *M. vaccae*, *M. phlei*.

Полученные результаты свидетельствуют о широком распространении атипичных микобактерий среди крупного рогатого скота, во внешней среде не только в благополучных, но и в длительно неблагополучных по туберкулезу хозяйствах. Приведенные данные не согласуются с выводом Т.И. Байтеряковой, Ю.А. Макарова (1982), И.Н. Рубцовой и др. (1986) о том, что выделение культур атипичных ми-

кобактерий из биологического материала, полученного от реагировавших на туберкулин животных, является одним из показателей оздоровления или благополучия хозяйств по туберкулезу.

Результаты наших исследований были подтверждены работами А.Ф. Кочмарского, М.В. Шевцова (1988), которые показали, что почти во всех хозяйствах имеется фон неспецифической сенсibilизации и в ряде случаев туберкулез может протекать на фоне общей неспецифической сенсibilизации животных.

Анализ видового состава атипичных микобактерий, изолированных от крупного рогатого скота, молока, смывов с молочного оборудования, в хозяйствах с различной эпизоотической ситуацией по туберкулезу указывает на их определенное сходство. Следует отметить, что из проб секционного материала, молока, смывов в основном выделялись культуры быстрорастущих микобактерий. Так, из 78 культур микобактерий 51 культура, или 65,4%, классифицированы как представители IV группы по Е.Н. Runyon.

Более поздние исследования В.Н. Донченко и др. (1987), Л.В. Погуляевой, Л.А. Ильиных (1988), проведенные по изучению видового состава микобактерий, изолированных от животных и из объектов внешней среды в хозяйствах Новосибирской и Омской областей, подтверждают наши данные.

Аналогичные результаты получены при определении микобактериального фона мочи животноводов в хозяйствах Новосибирской области. Автор установила, что атипичными микобактериями чаще инфицируются жители сельской местности, чем городской. В то же время микобактерии, как правило, обнаруживаются в моче лиц, имевших контакт с сельскохозяйственными животными.

Приведенные результаты указывают на то, что крупный рогатый скот, инфицируясь атипичными микобактериями из внешней среды (водоисточники, пастбища), становится их источником и способствует концентрации этих

микроорганизмов на фермах, что предопределяет высокий процент изоляции культур атипичных микобактерий из проб диагностического материала, полученного от животных и мочи животноводов. Доказательством этого являются исследования И.М. Блехмана и др. (1981), и С.Д. Басыбекова и др. (1985), которые подтвердили идентичность видов атипичных микобактерий, выделенных из патологического материала различного характера от туберкулиноположительного крупного рогатого скота и мочи животноводов.

При видовой идентификации атипичных микобактерий мы испытывали ряд трудностей, так как совокупность культуральных, биохимических признаков изучаемых культур не всегда соответствовала признакам известных видов микобактерий. Исходя из существующей в настоящее время практики идентификации микроорганизмов, не учитывающей их изменчивости, необходимо заключить, что каждая популяция микроорганизмов в природе образована своей разновидностью. Это является следствием не только изменчивости микроорганизмов, но и следствием того, что ряд признаков, используемых для идентификации, характеризует скорее эколого-физиологические связи микроорганизмов, чем таксономические.

Анализ литературных данных и полученные нами результаты свидетельствуют, что атипичные микобактерии имеют больше преимуществ в борьбе за существование, чем возбудитель туберкулеза бычьего вида, и, согласно принципу конкурентного исключения Гаузе, два вида с одинаковыми экологическими потребностями не могут существовать в одном месте обитания, происходит вытеснение старого вида. Однако при избытке ресурсов конкуренция может и не иметь места, разные виды могут сосуществовать, что мы и наблюдали в процессе исследования. Селекционирующиеся новые виды способны противостоять факторам естественной резистентности, вступив с организмом в симбиотические связи и, что самое главное, они могут приобретать свойства кислотоустойчивых сапрофитов, что дает им возможность суще-

ствовать вне организма, накапливаться и распространяться, занимая все новые экологические ниши. В этом мы находим объяснение сосуществованию разных видов микобактерий среди крупного рогатого скота в хозяйствах с различной эпизоотической ситуацией по туберкулезу.

Изучение морфологических и тинкториальных свойств выделенных культур микобактерий показало, что атипичные микобактерии отличались от микобактерий туберкулеза бычьего вида большим полиморфизмом, они имели разнообразную форму, величину, расположение, некоторые из них были неравномерно окрашены.

Учитывая простоту, доступность методики Л.Е. Скрябиной (1955), мы изучили возможность ее применения для дифференциации возбудителя туберкулеза от атипичных микобактерий. Исследованиями установлено, что микобактерии туберкулеза бычьего и птичьего видов не обесцвечивались под действием 0,01%-го раствора гипохлорита калия. Однако единичные клетки частично теряли кислотоустойчивость и приобретали розово-фиолетовую окраску. Очевидно, это связано с присутствием в популяциях этих микроорганизмов молодых особей, которые не всегда обладают выраженной кислотоустойчивостью. Такие же результаты были получены с культурой *M. intracellulae*, что можно объяснить идентичностью биохимической природы этих микобактерий с микобактериями птичьего вида (Tsukamura, 1981). Аналогичные результаты получены Н.М. Колычевым (1984) при изучении воздействия раствора гипохлорита калия на микобактерии туберкулеза бычьего и птичьего видов с целью их дифференциации. Медленнорастущие микобактерии: *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. terrae* — также проявляли устойчивость к воздействию жавелевой воды, но в меньшей степени, чем микобактерии туберкулеза. В популяциях этих микроорганизмов обесцвечивалось до 50% клеток. Быстрорастущие микобактерии обесцвечивались в 90-95% случаев, что полностью совпадает с результатами автора метода. Следует отметить, что потенциально патогенный вид *M. for-*

tuutum оказался более резистентным к данному раствору в сравнении с другими быстрорастущими микобактериями.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что методика Л.Е. Скрыбиной не позволяет провести дифференциацию возбудителя туберкулеза бычьего вида от других медленно растущих атипичных микобактерий с высокой степенью достоверности. Однако использование методики может дать предварительный ответ при дифференциации медленно растущих микобактерий от быстрорастущих.

Исследованиями прошлых лет была показана высокая эффективность метода микрокультивирования для ранней и быстрой диагностики туберкулеза (Дыхно и др., 1956).

R. Dubos и G. Middlebrook в 1947 г. выявили разницу в характере роста микроколоний неvirulentных и virulentных культур микобактерий: последние образуют переплетающиеся жгуты. Это явление, получившее название корд-фактор, связывают с липидными структурами, расположенными по периферии бактериальной клетки. По мнению некоторых авторов, существует зависимость между субмикроскопической организацией поверхностных структур, с одной стороны, virulentностью и корд-фактором — с другой.

При изучении кордообразующей способности нами было установлено, что феномен кордообразования присущ не только микобактериям туберкулеза, но и некоторым атипичным микобактериям, а именно: микобактериям комплекса MAIS, *M. fortuitum*, *M. diernhoferi*, хотя М.М. Дыхно и др. (1956), Р.О. Драбкина (1963), А.А. Солонко, А.К. Анищенко (1973), И.П. Билько (1988) считают, что образование кислотоупорными бактериями микроколоний в виде жгутов является характерной особенностью, присущей virulentным туберкулезным микобактериям. Они отмечают, что указанные морфологические особенности микрокультур могут служить руководством для определения возбудителей туберкулеза.

С. Asselineau, J. Asselineau (1978) установили, что образцы корд-фактора, выделенного из разных видов и даже штаммов микобактерий, различаются строением миколовых кислот. О.А. Нестеренко и др. (1985) объясняют наличие данного феномена тем, что атипичные микобактерии синтезируют аналоги миколовых кислот.

Проведенные исследования дают основание заключить, что метод микрокультивирования не позволяет дифференцировать разные виды микобактерий. К такому же выводу пришли Т.И. Байтерякова, Р.Х. Зайнуллина (1981). Они считают, что дифференцировать возбудитель туберкулеза бычьего вида от птичьего и других атипичных микобактерий с помощью феномена кордообразования не представляется возможным. Но в то же время следует отметить, что метод микрокультивирования является удобным для экспериментальных наблюдений за развитием микобактерий.

Изучение культуральных и биохимических свойств выделенных культур микобактерий с целью их идентификации показало, что все использованные нами методы являются ценными только при комплексном их применении. Идентификация культур с использованием отдельных культурально-биохимических тестов может привести к ошибочным результатам, так как надежность реакции зависит от качества химических реактивов, количества бактериальной массы, состава питательной среды и пр. (Кадочкин, 1984; Юдин, 1986; Jenkins, 1988).

Если результаты, полученные при использовании таких тестов, как скорость роста в субкультуре, рост при разных температурных режимах, рост на среде Левенштейна-Йенсена с 5%-м хлористым натрием, рост на МПБ и МПА, не вызывали сомнений, то результаты, полученные при использовании тестов с салицилатом и парааминосалицилатом натрия, не у всех штаммов *M. bovis* были идентичными, что затрудняло их оценку. Литературные данные свидетельствуют о том, что микобактерии туберкулеза человеческого и бычьего видов, в отличие от других видов, не растут на

среде Левенштейна-Йенсена с добавлением указанных препаратов (Зыков, Ильина, 1978).

В наших исследованиях салицилат и парааминосалицилат натрия полностью ингибировали рост только у 7 штаммов *M. bovis* из 11, у остальных 4 происходила задержка роста, и на поверхности среды появлялись единичные колонии (2-3), характерные для возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота.

Если предположить по аналогии с лекарственной чувствительностью, что популяция микобактерий может быть неоднородной и состоять из клеток чувствительных и устойчивых к этим препаратам, то появление единичных колоний на среде с добавлением салицилата и парааминосалицилата натрия становится вполне объяснимым. Поэтому при оценке результатов тестов появление единичных колоний не учитывали, а дающие такой рост культуры считали чувствительными к этим препаратам.

Что касается идентификации *M. fortuitum*, то исследования показали, что все культуры быстрорастущих микобактерий хорошо росли на среде Левенштейна-Йенсена с добавлением салицилата и парааминосалицилата натрия, но цвет среды изменялся только при посеве культуры *M. fortuitum*, что соответствует литературным данным. Механизм окрашивания среды состоит в том, что в процессе роста на среде этот вид микроорганизмов превращает салицилат натрия и ПАСК в катехол, а формазан, окрашивающий среду в черный цвет, является продуктом окисления катехола.

М. Tsukamura (1962) отмечает, что достаточно двух положительных тестов с салицилатом натрия и ПАСК, чтобы отнести исследуемую культуру к виду *M. fortuitum*. Результаты наших исследований также подтверждают этот вывод и согласуются с данными М.П. Зыкова, Т.Б. Ильиной (1978).

На основании проведенных исследований считаем, что для большинства видов микобактерий из биохимических тестов наиболее информативными являются: ниациновый, редукции нитратов, гидролиза твина-80, арилсульфатазный,

амидазной активности, термостабильности каталазы, разрушения салицилата и парааминосалицилата натрия до катехола. Следует отметить, что определение арилсульфатазной и амидазной активности сопряжено с определенными трудностями, так как ингредиенты, необходимые для проведения реакций, являются дефицитными и дорогостоящими.

Различная лекарственная чувствительность микобактерий наряду с ферментативной активностью клетки является одним из признаков, позволяющих дифференцировать микобактерии, поэтому многие исследователи рекомендуют использовать этот признак как один из дополнительных при дифференциации культур (Дыхно, 1964; Рубцова и др., 1981; Керимжанова, Макаревич, 1981). При изучении лекарственной чувствительности у выделенных культур микобактерий нами установлено, что все культуры микобактерий туберкулеза бычьего вида обладали тройной чувствительностью к туберкулостатическим препаратам I ряда (стрептомицин, изониазид, ПАСК). Культуры микобактерий, дифференцированные как атипичные, проявляли высокую устойчивость к изониазиду и ПАСК, что согласуется с результатами других исследователей. Отмечено, что ПАСК и изониазид, добавленные в среду Левенштейна-Йенсена в количестве 100,0 и 200,0 мкг на 1 мл среды, способствовали более интенсивному росту быстрорастущих микобактерий. Если к ПАСК и изониазиду высокую резистентность проявляли все культуры атипичных микобактерий, то к стрептомицину только 69,4% культур. Данные, приводимые в литературе по этому вопросу, весьма противоречивы. Так, Р.О. Драбкина (1963), А.И. Тогунова (1966) считают, что скотохромогенные микобактерии II группы по классификации Е.Н. Runyon и быстрорастущие микобактерии IV группы обладают высокой устойчивостью к ПАСК, изониазиду и стрептомицину. По данным S. Virtanen (1963), некоторые штаммы быстрорастущих микобактерий чувствительны к стрептомицину. Это противоречие объясняется многообразием штаммов внутри одного вида, а также применением

различных методик по определению лекарственной устойчивости и разными критериями оценки результатов теста.

Изучение лекарственной чувствительности у выделенных и музейных культур микобактерий удостоверяет, что наибольшей устойчивостью к противотуберкулезным препаратам I ряда обладают микобактерии III и IV групп по классификации Е.Н. Runyon. В.И. Должанский (1964) пишет, что отклонений от этого правила много и это снижает диагностическую ценность метода. Поэтому использовать тест по определению лекарственной устойчивости нужно только в комплексе с другими культурально-морфологическими и биохимическими методами.

Исходя из литературных данных, самым надежным методом идентификации микобактерий является воспроизведение экспериментального туберкулеза на морских свинках и кроликах. При этом наиболее достоверные результаты получают при использовании в биопrobe культуральной суспензии, а не суспензии, приготовленной из патологического материала (Овдиенко, 1986). В настоящее время многие исследователи занимаются поиском новых экспериментальных моделей и отрабатывают нетрадиционные методы заражения лабораторных животных, которые способны ускорить и повысить чувствительность биологической пробы, а также позволяют провести дифференциацию возбудителей туберкулеза от атипичных микобактерий (Мартма, Тюри, 1968; Клебанова, Брауде, 1964; Батуро, 1984; Идрисова, 1984; Красота, Якушева, 1988 и др.).

С этой целью нами были изучены сравнительные данные интратестикалярного, подкожного и внутрикожного методов заражения лабораторных животных различными культурами микобактерий. Проведенные исследования показали, что при интратестикалярном методе заражения морских свинок микобактериями туберкулеза бычьего вида их гибель наступала на 7-12 дней раньше, чем при подкожном. Возможно, данный метод заражения способствует более быстрой генерализации процесса, что подтверждают и бо-

лее поздние исследования К.К. Ашимовой (1990). При том и другом методах заражения у свинок развивались изменения, характерные для генерализованного туберкулеза, которые независимо от метода введения культуры были идентичными. Исключением являлись изменения, развивающиеся в месте введения микобактерий. По степени выраженности специфических изменений ни один из методов преимуществ не имел, о чем свидетельствовали индексы пораженности внутренних органов и лимфатических узлов. Высеваемость микобактерий всех штаммов бычьего вида из патологического материала, полученного от свинок, зараженных интратестикулярно, была значительно выше, чем при подкожном заражении. Полученные результаты несколько позже были подтверждены работами А.С. Соколовой и др. (1987), Л.А. Красота, Н.А. Донченко (1988). Таким образом, использование интратестикулярного метода заражения позволяет ускорить исследование с целью подтверждения диагноза на туберкулез.

Наши исследования также показали, что интратестикулярный метод заражения морских свинок является более чувствительным в сравнении с подкожным для выявления потенциальной патогенности атипичных микобактерий. Изучаемые культуры атипичных микобактерий обладали неодинаковой специфической патогенностью, на что указывал характер патоморфологических изменений в органах и тканях лабораторных животных, инфицированных данными микобактериями. Установлено, что *M. avium*, *M. phlei*, *M. fortuitum* вызывали гистоморфологические изменения, которым свойственны черты неспецифического и туберкулезного воспаления. Следует отметить, что такие изменения развивались у свинок и при подкожном методе заражения, но в значительно меньшей степени, что подтверждалось показателями селезеночного индекса. Наиболее выраженный неспецифический процесс наблюдали у свинок, инфицированных *M. phlei* и *M. fortuitum*. Специфические же изменения в большей степени формировались у животных, зараженных

M. avium. Идентичные изменения отмечали при интратестикулярном заражении морских свинок *M. intracellularae*. Полученные результаты согласуются с результатами медицинских исследователей З.С. Земковой, И.Р. Дорожковой (1984), которые отмечали, что развитие неспецифических реакций у животных, зараженных атипичными микобактериями, говорит о наличии у них определенных сапрофитных свойств. Способность вызывать специфические (туберкулезные) изменения свидетельствует о том, что атипичные микобактерии имеют некоторые иммуногенные свойства, присущие типичным туберкулезным микобактериям. Таким образом, указанные изменения являются незначительными, так как животные остаются практически здоровыми и могут быть расценены как тканевые реакции иммунитета на введение атипичных микобактерий. Полученные результаты не подтверждают вывод Э.И. Тюри и М.Э. Тюри (1964), О.В. Марта (1971) о том, что атипичные микобактерии всех четырех групп по классификации Е.Н. Runyon являются патогенными для морских свинок, вызывая у них генерализованный туберкулезоподобный процесс, который через месяц после заражения подвергается обратному развитию.

Наши исследования показали, что у свинок, инфицированных *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, явные макроскопические изменения, характерные для туберкулеза, не развивались. Однако у свинок, зараженных *M. avium* интратестикулярно, через 30 дней в печени формировались единичные некротические очажки, которые через 90 дней подвергались обратному развитию. По истечении 3 мес изменения сохранялись лишь в месте введения микобактерий в виде небольших, единичных, инкапсулированных абсцессов. Приведенные результаты нашли подтверждение в работах Л.А. Красота, Н.А. Донченко (1988).

Известно, что отличительной особенностью морских свинок является их чувствительность к микобактериям туберкулеза бычьего и человеческого видов. Однако даже у этих животных наблюдается существенная разница в сте-

пени вовлечения отдельных органов и тканей в туберкулезный процесс, ибо некоторые ткани обладают естественной устойчивостью к данным микроорганизмам. Почки, щитовидная железа, матка, скелетная система сравнительно устойчивы, в то время как легкие, селезенка и печень — более чувствительны. Результаты опытов удостоверяют, что семенники являются более чувствительными к возбудителю туберкулеза и атипичным микобактериям в сравнении с другими органами. Очевидно, поэтому изменения, возникающие в семенниках при интратестикулярном заражении свинок микобактериями, появляются раньше, чем в других органах, и сохраняются в них более длительное время.

Продолжая исследования, начатые в медицине А.П. Батуро (1964), М.М. Дыхно (1964) и в ветеринарии, мы использовали внутрикожный метод введения различных культур микобактерий морским свинкам и кроликам в нескольких модификациях с целью их дифференциации. Судя по размерам кожных поражений и длительности течения местного процесса, наибольшей патогенностью для кроликов и свинок обладали микобактерии туберкулеза бычьего вида, которые к 20-му дню обуславливали развитие кожного дефекта в виде язвы, заполненной казеозными массами, без склонности к заживлению. Диаметр максимального кожного поражения в день гибели у свинок составил $16,5 \pm 0,1$ мм, у кроликов на ушной раковине — $19,0 \pm 2,9$, на лапках — $15,4 \pm 1,5$ мм. У всех животных, зараженных микобактериями туберкулеза бычьего вида, развивался генерализованный туберкулезный процесс, но сроки их гибели были различными. Морские свинки погибали через $51,3 \pm 1,0$ дня с числовым показателем СИ (селезеночный индекс) $3,3 \pm 0,2$; кролики, зараженные в кожу уха, — через $86,0 \pm 3,0$ дня и зараженные в лапки — через $101,0 \pm 2,8$ дня. Подобные изменения в месте введения микобактерий туберкулеза отмечали А.А. Клебанова, В.И. Брауде (1964), К.Г. Идрисова (1984).

Микобактерии птичьего вида вызывали образование воспалительных инфильтратов и небольших язв без казеоз-

ного отделяемого, которые подвергались обратному развитию у морских свинок к 20-му дню, у кроликов — к 30-му дню. Нефотоксичные *M. gastri*, *M. terrae*, в отличие от *M. avium*, вызывали у лабораторных животных быстропроходящие кожные реакции, незначительные по интенсивности проявления. Известно, что микобактерии туберкулеза птичьего вида, как правило, являются для кроликов патогенными и вызывают их гибель; возможно, этим объясняется различие в интенсивности проявления внутрикожных реакций и их продолжительности у кроликов и морских свинок. Скотохромогенные культуры микобактерий приводили к развитию небольших кожных поражений в виде язв, реакции сохранялись у кроликов в течение 30-35 дней, у морских свинок — 15-18 дней. Из быстрорастущих микобактерий только *M. fortuitum* и *M. phlei* вызывали образование неглубоких, незначительных по размерам язвочек, которые подвергались обратному развитию при введении *M. fortuitum* в течение двух недель, при введении *M. phlei* у свинок в течение 18 дней, у кроликов — 20-25 дней. Полученные данные согласуются с результатами Г.А. Красникова, А.Н. Харченко (1981), которые отмечали либо отсутствие реакции в месте введения быстрорастущих микобактерий, либо возникновение инфильтратов или небольших кожных дефектов, имеющих тенденцию к раннему обратному развитию.

Учитывая, что характер изменений в месте введения различных видов микобактерий у кроликов и морских свинок, как правило, идентичен, а сроки их проявления короче у морских свинок, пришли к заключению, что для дифференциации выделенных культур микобактерий следует использовать морских свинок.

Изучение сенсибилизирующих свойств атипичных микобактерий, выделенных от крупного рогатого скота, реагирующего на туберкулин, и этих же культур, выделенных с тест-объектов, подвергавшихся воздействию 3%-го щелочного раствора формальдегида, показало, что *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. phlei* при интратрахеальном введении вызы-

вали у телят 4-месячного возраста аллергические реакции на ППД-туберкулин и КАМ, различные по интенсивности и продолжительности. В течение эксперимента (срок наблюдения 226 дней) реакции отмечали у 9, или 39,1%, животных, из них у 7 (30,4%) реакции появлялись на оба аллергена и у 2, или 6,7%, телят только на КАМ. Независимо от того, подвергались культуры атипичных микобактерий воздействию дезинфектанта или нет, они обладали сенсибилизирующей способностью.

Было установлено, что заметно чаще, интенсивно и более продолжительно реагировали на ППД-туберкулин и КАМ телята, зараженные микобактериями птичьего вида. Так, из 6 телят, зараженных этими микобактериями, на оба аллергена реагировали 4, у которых реакция продолжалась в течение 106-151 дня, у 1 из них реакция на введение КАМ наблюдалась в течение 196 дней. В группе телят, зараженных *M. phlei*, аллергические реакции на ППД-туберкулин и КАМ отмечали у 3 животных, из них у 2 внутрикожные реакции отмечались в течение 62-106 дней, у 1 из 3 телят регистрировали реакцию только на КАМ, длившуюся 151 день.

Самыми кратковременными были реакции у животных, зараженных *M. fortuitum*, продолжавшиеся у 2 телят в течение 28-62 дней. Следует отметить, что наиболее длительные и интенсивные реакции развивались у телят на введение аллергена, приготовленного из атипичных микобактерий (КАМ). Полученные данные согласуются с результатами О.В. Мартмы, К.К. Тяхнаса (1978), А.М. Кадочкина (1979), М. Назарова (1983), Г.А. Юдина (1986), которые в экспериментах доказали, что атипичные микобактерии комплекса *avium-intracellulae*, *M. scrofulaceum*, *M. phlei*, *M. fortuitum* сенсибилизируют организм животных при подкожном, внутривенном и алиментарном заражении, вызывая у них аллергические реакции, сохраняющиеся в течение 3-8 мес.

В наших исследованиях культура *M. smegmatis* ни в одном случае не вызывала сенсибилизацию телят к ППД-

туберкулину и КАМ. Идентичные результаты были получены А.В. Ткачевым-Кузьминым (1981), А.М. Кадочкиным, А.В. Ткачевым-Кузьминым (1983, 1989) при подкожном заражении телят 3-5-месячного возраста, несмотря на то, что заражающая доза в их опытах была в 2 раза больше (500 мг на животное). В исследованиях М. Pavlas (1965), Н.М. Мандро и др. (1985) данный вид микобактерий обладал сенсibiliзирующей способностью и вызывал аллергические реакции к туберкулину и моновидовому аллергену у коров 5-6-летнего возраста и у быков 18-20-месячного возраста. Возможно, противоречивость полученных данных можно объяснить различными методами заражения животных и многообразием штаммов микобактерий внутри одного вида.

При ветеринарно-санитарной экспертизе туш телят, убитых с диагностической целью в конце опыта (через 226 дней), изменений, характерных для туберкулеза, мы не обнаружили, однако, по данным О.В. Мартмы (1988), микобактерии комплекса *avium-intracellulae* вызывали у телят туберкулоподобные изменения в лимфатических узлах и органах, трудно отличимые от туберкулезных. У животных, зараженных *M. avium*, *M. phlei* и *M. fortuitum*, мезентеральные, заглочные и подчелюстные лимфоузлы были значительно увеличены, на разрезе сочные и по всей поверхности часто имели множественные точечные и диффузные кровоизлияния. У теленка (№ 3003), зараженного *M. phlei*, помимо кровоизлияний в заглочных, подчелюстных и средостенных лимфатических узлах, в предлопаточном обнаружили инкапсулированный очаг величиной с небольшой грецкий орех, заполненный густым гнойным содержимым. Аналогичную картину, также в предлопаточных лимфоузлах, наблюдали L. Corner, C. Person (1978) при заражении быков *M. intracellulae* и одним из штаммов быстрорастущих микобактерий (вид микобактерий в статье не указан) под кожу и в брыжеечный лимфатический узел.

При гистологическом исследовании лимфатических узлов от телят, зараженных атипичными микобактериями

(*M. avium*, *M. phlei*, *M. fortuitum*), установили повышенную пролиферацию клеток лимфоидной ткани фолликулов, а также пролиферацию ретикулярной ткани. В печени телят, зараженных микобактериями птичьего вида, находили среди гистиоцитов единичные клетки эпителиоидного типа. Полученные результаты подтверждают исследования А.М. Кадочкина (1979), М.В. Харитоновой (1983), Г.А. Юдина (1987), которые также не находили типичных для туберкулеза патоморфологических изменений у крупного рогатого скота, зараженного культурами атипичных микобактерий, или в лимфоузлах отдельных животных обнаруживали скопления лимфоидных и иногда эпителиоидных клеток.

Несмотря на многочисленные исследования различных авторов, посвященные изучению атипичных микобактерий, их роль в патологии крупного рогатого скота окончательно не выяснена. Так, Р.В. Тузова (1983) считает, что у коров и телят, инфицированных возбудителем туберкулеза птиц, наряду со специфическими туберкулезными поражениями отмечаются параспецифические патолого-анатомические изменения, которые специфичны для туберкулеза в стадии латентного микробизма, а возбудитель туберкулеза птичьего вида, пассивированный через организм крупного рогатого скота в естественных условиях, является патогенным для коров и телят в эксперименте.

Образование туберкулезных гранулем наблюдали L. Corner, C. Pearson (1978) у быков, зараженных различными штаммами *M. intracellulae* и одним из видов быстрорастущих микобактерий.

О.В. Мартма, К.К. Тяхнас (1978) связывают длительность сохранения аллергических реакций у некоторых животных, зараженных атипичными микобактериями более 6 мес, с возникновением в организме специфических морфологических изменений. После их регрессии в более поздние сроки реакции угасают. Авторы считают, что длительность состояния сенсибилизации у телят зависит от приживаемости атипичных микобактерий в организме за счет их размножения.

При бактериологическом исследовании секционного материала от телят, убитых с диагностической целью в конце эксперимента (через 226 дней), нами были получены культуры от четырех животных, зараженных *M. avium* и *M. phlei*, которые по своим культурально-морфологическим, биохимическим и биологическим свойствам соответствовали характеристикам исходных культур микобактерий. Этот факт свидетельствует о способности данных микобактерий прижиться в организме крупного рогатого скота в течение 226 дней. О выделении исходных культур от экспериментально зараженных животных сообщали А.М. Кадочкин (1979, 1981), Н. Назаров (1983). Согласно их данным, исходные культуры выделялись из организма с молоком, фекалиями в течение 15-55 дней и из патологического материала через 11 недель после заражения животных. Однако следует отметить, что не всем исследователям удавалось изолировать исходные культуры атипичных микобактерий из секционного материала от животных. Таким образом, проведенные исследования удостоверяют, что атипичные микобактерии *M. avium*, *M. phlei*, *M. fortuitum* обладают сенсibiliзирующей способностью, но не являются для них патогенными.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют, что многообразие видов атипичных микобактерий, выделяемых от реагирующих на туберкулин животных и из объектов внешней среды, их идентичные свойства с возбудителями туберкулеза крупного рогатого скота и человека в ряде случаев осложняют диагностику туберкулеза, а присущие этим видам потенциальная патогенность и сенсibiliзирующие свойства требуют дальнейшего изучения их характеристик, методов дифференциации и идентификации для оптимизации методов борьбы с туберкулезом и предупреждения необоснованного убоя животных, инфицированных атипичными микобактериями.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК к части 2

1. *Акулов А.В.* Сенсibiliзирующие свойства и патогенная роль атипичных микобактерий / А.В. Акулов, В.С. Тырина // Ветеринария. — 1969. — № 10. — С. 43-45.
2. *Акулов А.В.* Морфологические реакции у животных, вызванные кислотоустойчивыми сапрофитами / А.В. Акулов, Г.А. Юдин, В.С. Земскова // Ветеринария. — 1967. — № 9. — С. 43-45.
3. *Алагезян Р.Г.* Методика испытания моющих и дезинфицирующих средств для санитарной обработки молочного оборудования на заводах / Р.Г. Алагезян // Материалы международного симпозиума по дезинфекции и стерилизации. — М., 1972. — С. 31-32.
4. *Александров Н.А.* К вопросу о природе атипичных микобактерий и их возможной роли в возникновении параллергических реакций на туберкулин / Н.А. Александров // Тр. Саратов. н.-и. вет. станции. — 1974. — № 9. — С. 386.
5. *Александров Н.А.* Эпидемиологическое значение кислотоустойчивых сапрофитов, выделенных из полевых водоемов / Н.А. Александров // Пробл. туберкулеза. — 1973. — № 10. — С. 76-77.
6. *Аликаева А.П.* Упрощенный метод выделения БК из патологического материала / А.П. Аликаева // Сов. ветеринария. — 1940. — № 11-12. — С. 47-48.
7. *Аликаева А.П.* Упрощенный метод типирования туберкулезных культур / А.П. Аликаева, Т.П. Жерносек // Ветеринария. — 1950. — № 4. — С. 40.
8. *Аликаева А.П.* Об идентификации выделенных от кур атипичных микобактерий / А.П. Аликаева, О.В. Якушева // Тр. Всесоюз. ин-та эксперимент. ветеринарии. — 1978. — Т. 47. — С. 48-52.
9. *Аллергические* реакции у телят, зараженных атипичными микобактериями туберкулеза / И. А. Каркадиновская и др. // Материалы XV науч. конф. — Л., 1966. — С. 16-18.
10. *Андреев Л.В.* О хемотаксономических аспектах липидного обмена бактерий / Л.В. Андреев, А.К. Склифас //

Биохимия и биофизика микроорганизмов. — Горький, 1977. — № 5. — С. 3-9.

11. *Аржаков В.Н.* Устойчивость микобактерий туберкулеза к некоторым физическим агентам / В.Н. Аржаков, И.Н. Кучеренко // Система мер борьбы с туберкулезом сельскохозяйственных животных: сб. науч. тр. / Всерос. акад. с.-х. наук им. Ленина. Сиб. отд-ние. — Новосибирск, 1991. — С. 118-125.

12. *Асташова Е.А.* Ультраструктурные изменения и особенности атипичных микобактерий при культуральном росте на среде Левенштейна-Йенсена / Е.А. Асташова // Бюл. Всесоюз. ин-та эксперимент. ветеринарии. — М., 1983. — Вып. 51. — С. 38—42.

13. *Ашимова К.К.* Патоморфологические изменения у морских свинок, зараженных туберкулезом / К.К. Ашимова // Вестн. с.-х. науки Казахстана. — 1990. — № 8. — С. 84-87.

14. *Байдакова З.Л.* О некоторых методах типирования туберкулезных штаммов / З.Л. Байдакова // Борьба с туберкулезом. — 1933. — № 9. — С. 27-32.

15. *Байтерякова Т.И.* Распространение атипичных микобактерий в молочной зоне Семипалатинской области / Т.И. Байтерякова // Вопросы взаимосвязи туберкулеза. — 1981. — С. 170-174.

16. *Байтерякова Т.И.* Формы персистенции микобактерий в организме крупного рогатого скота из хозяйств с различным эпизоотическим состоянием: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Т.И. Байтерякова. — Новосибирск, 1983. — 25 с.

17. *Байтерякова Т.И.* Определение корд-фактора у микобактерий, культивированных в полужидком агаре Школьниковой, с помощью фазово-контрастной микроскопии / Т.И. Байтерякова, Р.Х. Зайнуллина // Совершенствование ветеринарных мероприятий в борьбе с инфекционными болезнями сельскохозяйственных животных в Казахстане: сб. науч. тр. — Алма-Ата, 1981. — С. 6-9.

18. *Байтерякова Т.И.* Результаты исследований на ту-

беркулез в разных эпизоотических ситуациях / Т.И. Байтерякова, Ю.А. Макаров // Ветеринария. — 1982. — № 10. — С. 61-62.

19. *Бактериологическая и биохимическая идентификация микобактерий: // метод. рекомендации / разработ. Т.Б. Ильина; Минздрав РСФСР. НИИ туберкулеза. — М., 1975. — 21 с.*

20. *Бараускене Л.П.* Метод определения ниацина с помощью бумажных полосок / Л.П. Бараускене // Пробл. туберкулеза. — 1974. — №1. — С. 75-77.

21. *Бараускене Л.П.* Микро-фенолфталеин-сульфатазный тест для идентификации *M. tuberculosis* / Л.П. Бараускене // Лаб. дело. — 1973. — № 6. — С. 342.

22. *Бараускене Л.П.* Комбинированный тест на ниацин и редукцию нитратов для идентификации микобактерий / Л.П. Бараускене // Пробл. туберкулеза. — 1972. — № 8. — С. 72-75.

23. *Бараускене Л.П.* Простые бактериологические методы дифференциации туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий / Л.П. Бараускене // Пробл. туберкулеза. — 1976. — № 8. — С. 69-75.

24. *Басыбеков С.Д.* Животные — источники микобактериозов у человека / С.Д. Басыбеков, Я.А. Благодарный, Н.Ж. Жанузаков. — Алма-Ата, 1985. — 112 с.

25. *Батуро А.П.* Дифференциация атипичных микобактерий и кислотоупорных сапрофитов при помощи внутрикожной пробы на морских свинках / А.П. Батуро // Пробл. туберкулеза. — 1984. — № 6. — С. 71-74.

26. *Баукин В. К* Диагностическая ценность люминесцентной микроскопии для выявления туберкулеза / В.Н. Баукин // Пробл. туберкулеза. — 1963. — № 5. — С. 82-83.

27. *Бибергалов Е.А.* Типирование микобактерий методом специфических ингибиторов / Е.А. Бибергалов // Лаб. дело. — 1991. — № 6. — С. 47-49.

28. *Билько И.Н.* Современные представления об ультраструктуре и функции клеточной стенки микобактерий

туберкулеза / И.Н. Билько, В.Г. Матусевич // Пробл. туберкулеза. — 1986. — №9. — С. 65-70.

29. *Билько И.Н.* Микроскопический тест для групповой дифференциации микобактерий / И.Н. Билько // Республ. межведомств. сб. — Киев, 1988. — Вып. 20. — 136 с.

30. *Благодарный Я.А.* Источники туберкулеза и меры профилактики / Я.А. Благодарный. — Алма-Ата, 1980. — 245 с.

31. *Благодарный Я.А.* Выделение атипичных микобактерий от спонтанно инфицированных птичьих клещей / Я.А. Благодарный, Н.М. Макаревич, И.М. Блехман // Пробл. туберкулеза. — 1971. — №6. — С. 74-76.

32. *Благодарный Я.А.* Сравнительная характеристика некоторых методов типирования микобактерий туберкулеза / Я.А. Благодарный, Э.В. Сидоркина // Пробл. туберкулеза. — 1971. — № 11. — С. 72-75.

33. *Блехман И.М.* Крупный рогатый скот — переносчик и возможный источник потенциально-патогенных микобактерий / И.М. Блехман, С.Д. Басыбеков и др. // Вопросы взаимосвязи туберкулеза человека и животных. — Алма-Ата, 1981. — С. 89-92.

34. *Блехман И.М.* Клеши *Argas persicus* — возможные переносчики туберкулезной инфекции у кур: автореф. дис. ... канд. биол. наук / И.М. Блехман. — Алма-Ата, 1972. — 19 с.

35. *Бокун А.О.* Сравнительное изучение некоторых особенностей микобактерий туберкулеза в различных условиях существования: автореф. дис.... канд. биол. наук / А.О. Бокун. — Львов, 1966. — 15 с.

36. *Бронштейн О.Н.* О типировании БК / О.Н. Бронштейн, М.В. Триус, А.А. Клебанова и др. // Борьба с туберкулезом. — 1934. — №10. — С. 49-50.

37. *Брудная Ю.Е.* Новый метод определения вирулентных нетуберкулезных микобактерий и слабовирулентных туберкулезных микобактерий / Ю.Е. Брудная, Н.Ф. Амфитеатрова, Н.М. Каугина // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 1987. — №11. — С. 9-12.

38. *Быстрорастущие* атипичные микобактерии и их значение в патологии рогатого скота / В.Е. Щуревский и др. // Ветеринария. — 1984. — № 9. — С. 29-30.

39. *Василев В.Н.* Микобактериозы и микозы легких / В.Н. Василев. — София, 1971. — 382 с.

40. *Вейсфейлер Ю.К.* Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичных микобактерий / Ю.К. Вейсфейлер. — Будапешт, 1975. — 335 с.

41. *Вейсфейлер Ю.К.* Обратимые и необратимые проявления изменчивости у возбудителя туберкулеза / Ю.К. Вейсфейлер // Борьба с туберкулезом. — 1934. — № 9-10. — С. 60-64.

42. *Вишневский П.П.* Сравнительная оценка различных методов определения вирулентности микобактерий туберкулеза / П.П. Вишневский // Пробл. туберкулеза. — 1973. — № 2. — С. 73-76.

43. *Воробьев А.А.* Использование физико-химических и электронно-микроскопических методов в дифференциации микобактерий / А.А. Воробьев, А.В. Куликовский и др. // Докл. Всерос. акад. с.-х. наук им. Ленина. — 1991. — № 5. — С. 48-52.

44. *Гарвей Н.Н.* Значение люминесцентной микроскопии тонких срезов аспиратов из бронхов в выявлении микобактерий туберкулеза / Н.Н. Гарвей, Е.В. Милованова, А.Ч. Ким // Проблемы туберкулеза. — 1980. — № 4. — С. 62-65.

45. *Гейденрейх Д.А.* О строении туберкулезной палочки / Д.А. Гейденрейх // Врач. — 1887. — № 32.

46. *Гизатуллин Х.Г.* О туберкулиновых реакциях, обусловленных атипичными микобактериями / Х.Г. Гизатуллин, Б.Л. Мазур, М.А. Сафин, Е.Б. Галкин // Ветеринария. — 1972. — № 9. — С. 52-58.

47. *Гинзбург Т.С.* Биологические свойства лекарственных-чувствительных микобактерий туберкулеза / Т.С. Гинзбург, Н.Т. Клименко, С.В. Сокало // Пробл. туберкулеза. — 1986. — № 7. — С. 58-60.

48. *Говоров А.М.* Вивчення алергічних серологічних реакцій у телят, імунізованих сапрофітними мікобактеріями / А.М. Говоров, Ю.Я. Кассич, А.Ю. Тесля і др. // Ветеринарія: респ. міжвед. темат. науч. сб. — 1970. — № 25. — С. 44-50.

49. *ГОСТ 26072-84 (СТ СЭВ 3457-81)* Сельськогосподарські тварини і птахів. Методи лабораторної діагностики туберкульозу. — М., 1984. — 11 с.

50. *Гращенко О.Я.* Вирулентність мікобактерій туберкульозу, циркулюючих на Крайньому Севері / М.Н. Зыков, О.В. Гращенко // Пробл. туберкульозу. — 1984. — № 7. — С. 51-55.

51. *Девятова А.И.* Ідентифікація мікобактерій з допомогою методу ТСХ / А.И. Девятова // Пробл. туберкульозу. — 1986. — №4. — С. 63-67.

52. *Диагностика* захворювань легких, викликаних нетуберкульозними мікобактеріями / Н.М. Макаревич і др. // X Всесоюз. съезд фтизіатрів: тез. докл. — Київ, 1986. — С. 85.

53. *Димов И.* Роль атипичних мікобактерій за появу на неспецифічних туберкулінових реакціях при гомодаті / И. Димов // Вет.-мед. науки. — 1985. — № 5. — С. 53-59.

54. *Дифференциация* *M. tuberculosis* і *M. bovis* з допомогою саліцилатного тесту і редукції нітратів / Т.Б. Ильина і др. // Пробл. туберкульозу. — 1987. — № 1. — С. 57-60.

55. *Должанский В.М.* О співвідношенні між фтиазидоустійчивістю і каталазною активністю кислотоустійчивих мікобактерій / В.М. Должанський // Пробл. туберкульозу. — 1964. — № 7. — С. 67-72.

56. *Должанский В.М.* Сравнительная характеристика «анормальных» кислотоупорных мікобактерій і їх антигенні зв'язки з іншими представителями роду: автореф. дис. ... канд. мед. наук/В.М. Должанський. — М., 1964. — 19 с.

57. *Домнин Б.Г.* Влияние кислотоустойчивых мікобактерій на организм крупного рогатого скота / Б.Г. Домнин // Ветеринарія. — 1967. — № 4. — С. 33.

58. Домнин Б.Г. Влияние микобактерий, выделенных из торфа, и туберкулезных микобактерий птичьего типа на организм телят в сравнительном аспекте / Г. Домнина, Б.Г. Домнин. — Ленингр. вет. ин-т. — Л., 1980. — С. 7.

59. Донченко В.Н. Экология различных видов микобактерий, изолированных от животных и объектов внешней среды на территории Сибири и Дальнего Востока / В.Н. Донченко, Н.И. Воробьева, А.С. Донченко // Тез. докл. зон. совещ. — Новосибирск, 1987. — С. 52-53.

60. Донченко А.С. Характеристика микобактерий, изолированных из материала животных и объектов внешней среды / А.С. Донченко, В.Н. Донченко, Г.М. Лисиченко // Вопросы эпизоотологии, диагностики и мероприятия по ликвидации туберкулеза и бруцеллеза животных: сб. науч. тр. - Новосибирск, 1987. — С. 28-32.

61. Донченко А.С. Люминесцентная микроскопия в диагностике туберкулеза / А.С. Донченко, В.Н. Донченко // Ветеринария. — 1977. — №6. — С. 100-103.

62. Донченко А.С. Молоко как фактор распространения туберкулеза среди сельскохозяйственных животных / А.С. Донченко // Организация противотуберкулезных мероприятий в эпизоотически неблагополучных территориях: тез. докл./ МЗ РСФСР. Всерос. акад. с.-х. наук им. Ленина. Сиб. отд-ние. — Новосибирск, 1987. — С. 11.

63. Донченко А.С. О выделении микобактерий туберкулеза с молоком больных коров / А.С. Донченко // Ветеринария. — 1972. — № 6. — С. 46-48.

64. Донченко А.С. Туберкулез верблюдов: рекомендации / А.С. Донченко; РАСХН. Сиб. отд-ние. ИЭСВиДВ. — Новосибирск, 1990. — 64 с.

65. Донченко А.С. Туберкулез крупного рогатого скота, верблюдов и овец: автореф. дис. ... д-ра вет. наук / А.С. Донченко. — Л., 1989. — 34 с.

66. Донченко А.С. Комплексная дифференциация неспецифических туберкулиновых реакций в условно благополучных пунктах / А.С. Донченко, Л.М. Ходун, Р.М. Сырт-

ланов и др. // Материалы Всесоюз. науч. конф. — Омск, 1980. — С. 109-112.

67. *Драбкина Р.О.* Микробиология туберкулеза / Р.О. Драбкина. — М., 1963. — 225 с.

68. *Дыхно М.М.* Биохимические особенности *M. avium* и *M. intracellulareae* / М.М. Дыхно // Материалы V Респ. науч.-практ. конф. фтизиатров Латв. ССР. — Рига, 1975. — С. 38-39.

69. *Дыхно М.М.* Дифференциация кислотоустойчивых сапрофитов от микобактерий туберкулеза и атипичных штаммов с помощью определения формамидазной активности / М.М. Дыхно, О.И. Земцова, В.М. Зайденов // Пробл. туберкулеза. — 1964. — № 9. — С. 63-66.

70. *Дыхно М.М.* Морфологические особенности микрокультур туберкулезных микобактерий и кислотоупорных сапрофитов / М.М. Дыхно, З.Н. Кочемасова, Ю.З. Гендон // Вопросы патологии туберкулеза и изменчивости его возбудителя: сб. науч. тр. — М., 1956. — С. 160-165.

71. *Дыхно М.М.* Патогистологические изменения ХАО куриного эмбриона при заражении различными микобактериями / М.М. Дыхно, Г.П. Сорокина, Л.Л. Шимкевич // Пробл. туберкулеза. — 1963. — № 2. — С. 51-57.

72. *Дыхно М.М.* Сравнительное изучение и методы дифференциации микобактерий туберкулеза: автореф. дис. ... канд. мед. наук / М.М. Дыхно. — М., 1964. — 29 с.

73. *Дюсембекова Б. С.* Дифференциация атипичных микобактерий и кислотоустойчивых сапрофитов: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Б.С. Дюсембекова. — Алма-Ата, 1971. — 19 с.

74. *Ерохин В.В.* Строение микобактерий туберкулеза по данным электронной микроскопии / В.В. Ерохин // Пробл. туберкулеза. — 1982. — № 3. — С. 55-59.

75. *Ерохин В.В.* Функциональная морфология респираторного отдела легких / В.В. Ерохин. — М., 1987. — С. 165-178.

76. *Жирно-кислотные эфиры сахаров микобактерий и*

родококков / К.Ю. Гордеев и др. // Микробиология. — 1991. — Т. 60, вып. 2. — С.263-267.

77. *Жусипбекова Г.А.* Бактериологическая характеристика микобактерий туберкулеза, выделенных от детей и подростков / Г.А. Жусипбекова, А.Е. Кривцова // Сб. науч. тр. НИИ туберкулеза. — Алма-Ата, 1987. — С. 103-107.

78. *Земскова З.С.* Скрытопротекающая туберкулезная инфекция / З.С. Земскова, И.Р. Дорожкова. — М., 1984. — 224 с.

79. *Зыков М.П.* Микробиология туберкулеза / М.П. Зыков. — Л., 1978. — 176 с.

80. *Зыков М.П.* Потенциально-патогенные микобактерий и лабораторная диагностика микобактериозов / М.П. Зыков, Т.Б. Ильина. — М., 1978. — 161 с.

81. *Идентификация* микобактерий с помощью ниацинового теста и некоторых других / Т.Б. Ильина и др. // Пробл. туберкулеза. — 1972. — № 11. — С. 66-70.

82. *Идрисова К.Г.* Определение вирулентности микобактерий, выделенных из материала реагирующих на туберкулин животных, методом внутрикожного заражения морских свинок / К.Г. Идрисова // Профилактика туберкулеза крупного рогатого скота: сб. науч. тр. / Казан. вет. ин-т. — Казань, 1984. — С. 18-21.

83. *Ильина Т.Б.* Арилсульфатазная активность микобактерий / Т.Б. Ильина, В.Д. Молдавер // Пробл. туберкулеза. — 1979. — №11. — С. 61-63.

84. *Ильина Т.Б.* Применение некоторых биохимических тестов для дифференциации микобактерий / Т.Б. Ильина, М.Л. Оречкина // Лабораторное дело. — 1972. — № 1. — С. 685-688.

85. *Ильина Т.Б.* Определение амидазной активности как метод идентификации микобактерий / Т.Б. Ильина // Проблемы туберкулеза. — 1971. — № 6. — С. 69-73.

86. *Инструкция* о мероприятиях по профилактике и ликвидации туберкулеза животных. — М., 1988. — 25 с.

87. *Исмаилов З.И.* Виды микобактерий, выделенных

от крупного рогатого скота личных подсобных хозяйств населения: автореф. дис. ... канд. биол. наук/ З.И. Исмаилов. — М., 1985. — 20 с.

88. *Ищенко Л.А.* Патогенные и сенсibiliзирующие свойства для телят атипичных и сапрофитных микобактерий, выделенных от крупного рогатого скота / Л.А. Ищенко // Науч. тр. — Воронеж, 1975. — Т. 70. — С. 41-43.

89. *Каграманов А.И.* Легочный микобактериоз / А.И. Каграманов // Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. — М., 1964. — Т. 6. — С. 611-618.

90. *Каграманов А.И.* Проблемы изменчивости возбудителя туберкулеза / А.И. Каграманов // Пробл. туберкулеза. — 1972. — №12. — С. 71-75.

91. *Каграманов А.И.* О дифференциации и идентификации культур, выделенных от сельскохозяйственных животных / А.И. Каграманов, Н.М. Макаревич // Современные вопросы эпидемиологии и выявления туберкулеза. — Алма-Ата, 1977. — С. 20-21.

92. *Каграманов А.И.* Некоторые вопросы экспериментальной химиотерапии туберкулеза / А.И. Каграманов // Тр. НИИ туберкулеза Акад. наук СССР. — М., 1956. — Т. 8. — С. 8-12.

93. *Каграманов А.И.* Об атипичных микобактериях / А.И. Каграманов // Пробл. туберкулеза. — 1963. — № 7. — С. 69-74.

94. *Кадочкин А.М.* Дифференциация и индентификация микобактерий / А.М. Кадочкин // Ветеринария. — 1984. — № 9. — С. 62-64.

95. *Кадочкин А.М.* Изучение атипичных нефотохромогенных микобактерий комплекса *avium-intracellarae* и их патогенность для лабораторных животных и крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. вет. наук/ А.М. Кадочкин. — М., 1979. — 13 с.

96. *Кадочкин А.М.* Атипичные микобактерий и их роль в сенсibiliзации животных к туберкулину / А.М. Кадоч-

кин, А.В. Ткачев-Кузьмин // Бюл. Всесоюз. ин-та эксперимент. ветеринарии. — М., 1983. — Вып. 51. — С. 50-53.

97. *Кадочкин А.М.* Взаимосвязь атипичных микобактерии с неспецифическими реакциями у крупного рогатого скота / А.М. Кадочкин, А.В. Ткачев-Кузьмин // Туберкулез сельскохозяйственных животных: сб. науч. тр. / Всерос. акад. с.-х. наук им. Ленина. Всерос. НИИ брцеллеза и туберкулеза животных. — Омск, 1989. — С. 103-115.

98. *Каримова Л.М.* Виды микобактерий, выделенных от крупного рогатого скота в разных эпизоотических ситуациях по туберкулезу / Л.М. Каримова, Б.Я. Хайкин // Совершенствование системы методов борьбы с бруцеллезом и туберкулезом животных: сб. науч. тр. / Всерос. акад. с.-х. наук им. Ленина. Сиб. отд-ние. — Новосибирск, 1987. — С. 92-98.

99. *Квасников Е.И.* Нуклеотидный состав ДНК быстрорастущих микобактерий и родственных микроорганизмов / Е.И. Квасников, Л.П. Панченко, О.А. Нестеренко // Микробиология. — 1978. — Т. 47, № 2. — С. 246-249.

100. *Кекчева Н.Г.* Микрокультуры туберкулезных микобактерий на синтетических средах / Н.Г. Кекчева // Вопросы патологии туберкулеза и изменчивости его возбудителя. — М., 1956. — С. 126-147.

101. *Керимжанова Б.Ф.* Лекарственная чувствительность микобактерий, выделенных от крупного рогатого скота и свиней в Казахстане / Б.Ф. Керимжанова, Н.М. Макаревич // Совершенствование ветеринарных мероприятий в борьбе с инфекционными болезнями сельскохозяйственных животных в Казахстане: сб. науч. тр. — Алма-Ата, 1981. — С. 22-29.

102. *Керимжанова Б.Ф.* Некоторые биохимические свойства атипичных микобактерий, выделенных от крупного рогатого скота в Казахстане / Б.Ф. Керимжанова // Инфекционные и инвазионные болезни сельскохозяйственных животных в Казахстане. — Алма-Ата, 1980. — С. 85-88.

103. *Клебанова А.А.* Изучение динамики морфологи-

ческих изменений в коже морских свинок для дифференциации кислотоустойчивых микобактерий / А.А. Клебанова, В.И. Брауде // Проблемы туберкулеза. — 1964. — № 6. — С. 64-71.

104. *Климмер М.* Туберкулез людей и птиц / М. Климмер // Ветеринарный специалист на социалистической стройке. — 1931. — №7. — С. 702-703.

105. *Кноринг Б.Е.* Применение иммунолюминесцентного метода для идентификации микобактерий туберкулеза и выявления специфических антител: дис. ... канд. биол. наук / Б.Е. Кноринг. — Л., 1970. — 304 с.

106. *Ковалев В.Г.* Значение амидов пирозин- и пиридинкарбоновых кислот для дифференциации микобактерий туберкулеза / В.Г. Ковалев // Лаб. дело. — 1981. — № 10. — С. 623-625.

107. *Ковалев В.Г.* Сравнительная характеристика некоторых питательных сред, используемых для дифференциации микобактерий *M. bovis* и *M. tuberculosis* / В.Г. Ковалев // Лаб. дело. — 1988. — №4. — С. 11-14.

108. *Козулицина Т.Н.* Современные методы идентификации кислотоустойчивых микобактерий / Т.И. Козулицина, Н.М. Макаревич, А.М. Кадочкин // Состояние и перспективы научных исследований по диагностике и профилактике туберкулеза бруцеллеза и меры борьбы с этими болезнями сельскохозяйственных животных: материалы Всесоюз. конф. — Омск, 1980. — С. 65-68.

109. *Козьмин-Соколов Б.Н.* Антигенные свойства микобактерий в реакции диффузионной преципитации в геле / Б.Н. Козьмин-Соколов // Журн. микробиологии. — 1966. — № 4. — С. 111-114.

110. *Колокшанская Л.В.* Характеристика и дифференциация микобактерий, выделенных при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Л.В. Колокшанская. — Витебск, 1974. — 16 с.

111. *Колычев Н.М.* Характеристика микобактерий, изолированных от человека, животных и с объектов внешней

среды / Н.М. Колычев, Н.С. Боганец, А.В. Лосева // Пробл. туберкулеза. — 1990. — №11. — С. 59-61.

112. *Колычев Н.М.* Приспособление для одномоментной окраски большого количества мазков методом Циль-Нильсена / Н.М. Колычев, С.Г. Письменная // Сб. науч. тр. Сиб. НИИ вет. ин-та. — 1976. — Вып. 26. — С. 56-59.

113. *Колычев Н.М.* Экологические особенности микобактерий туберкулеза // Совершенствование систем и методов в борьбе с бруцеллезом и туберкулезом животных. — Новосибирск, 1987. — С. 113-121.

114. *Кондюрин Н.Г.* Применение метода микрокультур для оценки качества дезинфекции при туберкулезе / Н.Г. Кондюрин, Н.М. Колычев // Ветеринария. — 1976. — № 2. — С. 107-110.

115. *Коронелли Т.В.* Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов / Т.В. Коронелли // Успехи микробиологии. — 1977. — №12. — С. 164-189.

116. *Коронелли Т.В.* Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов / Т.В. Коронелли. — М., 1984. — 158 с.

117. *Кособуцкий Л.А.* Фаги микобактерий / Л.А. Кособуцкий // Журнал микробиологии. — 1971. — № 1. — С. 79-84.

118. *Кочмарский А. Ф.* Эпизоотологическое значение различных видов микобактерий / А.Ф. Кочмарский, М.В. Шевцов // Ветеринария. — Киев, 1988. — Вып. 63. — С. 3-5.

119. *Красильников Н.А.* Определитель бактерий и актиномицетов / Н.А. Красильников. — М.; Л., 1949. — 830 с.

120. *Красников Г.А.* Кожные реакции у лабораторных животных на введение атипичных микобактерий / Г.А. Красников, А.Н. Харченко // Ветеринария. — 1981. — № 9. — С. 33-37.

121. *Красота Л.А.* Высеваемость микобактерий при подкожном и интратестикальном методах заражения морских свинок / Л.А. Красота, Н.А. Донченко // Профилактика и оздоровление животных от туберкулеза и бруцеллеза: сб.

науч. тр. / Всерос. акад. с.-х. наук им. Ленина. Сиб. отд-ние — Новосибирск, 1988. — С. 41-4.

122. *Красота Л.А.* Сравнительная оценка подкожного и интратестикулярного методов заражения морских свинок *M. avium* и *M. intracellulae* / Л.А. Красота, О.В. Якушева // Бюл. Всерос. акад. с.-х. наук им. Ленина. Сиб. отд-ние. — Новосибирск, 1988. — С. 37-40.

123. *Краткий* определитель Берги: пер. с англ. / под ред. Дж. Хоулта. — М., 1980. — С. 351-357.

124. *Кривцова А.К.* Первичная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза в Казахстане / А.К. Кривцова, Я.А. Благодарный // Пробл. туберкулеза. — 1974. — № 8. — С. 70-73.

125. *Кузин А.И.* Туберкулез сельскохозяйственных животных и его профилактика / А.И. Кузин. — М., 1992. — 189 с.

126. *Кузьмин Н.А.* Об идентификации возбудителей туберкулеза / Н.А. Кузьмин, В.М. Карташова, М.К. Исаев // Ветеринария. — 1971. — №3. — С. 44-46.

127. *Кузьев В.А.* К вопросу заражения крупного рогатого скота атипичными кислотоустойчивыми микобактериями / В.А. Кузьев // Тр. Молдав. ин-та животноводства и ветеринарии. — 1970. — Т. 5. — С. 208.

128. *Кузьев В.А.* Сравнительное изучение патогенности туберкулезных и атипичных микобактерий при пассажах на телятах: автореф. дис. ... канд. вет. наук / В.А. Кузьев. — Л., 1972. — 14 с.

129. *Куликовский А.В.* Сравнительное электронно-микроскопическое изучение микобактерий / А.В. Куликовский // Ветеринария. — 1979. — №2. — С. 29-33.

130. *Лабораторная* диагностика туберкулеза: рекомендации / Б.Я. Хайкин, Н.М. Колычев, Н.С. Боганец, Л.М. Каримова. — Омск, 1988. — 64 с.

131. *Лазовская А.Л.* Патогенные и условно-патогенные микобактерии / А.Л. Лазовская, И.Н. Блохина. — Горький, 1976. — 114 с.

132. *Левченко Т.Н.* Ультраструктурная организация

микобактерий туберкулеза / Т.Н. Левченко // Пробл. туберкулеза. – 1991. – №12. – С. 42-46.

133. *Макаревич Н.М.* Атипичные микобактерии: методы идентификации, источники выделения, течение, клиника туберкулеза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Н.М. Макаревич. — М., 1973. – 37 с.

134. *Макаревич Н.М.* Диагностика атипичных микобактерий по окислительно-восстановительным ферментам / Н.М. Макаревич, Ю.П. Афанасьева // Ветеринария. – 1968. – № 3. – С. 25-27.

135. *Макаревич Н.М.* Лекарственная чувствительность атипичных микобактерий, выделенных от больных, к противотуберкулезным препаратам 1 и 2 ряда / Н.М. Макаревич, И.М. Рудой // Антибиотики. – 1971. – № 2. – С. 149-159.

136. *Максутов А.М.* Отношение туберкулеза птиц к туберкулезу млекопитающих / А.М. Максутов // Архив вет. наук. – 1894. – Т. 2, кн. 2. – С. 415-124.

137. *Мандро Н.М.* Сенсibiliзирующие свойства кислотоустойчивых микобактерий / Н.М. Мандро, В.Н. Донченко, А.С. Донченко // Науч.-техн. бюл. Всерос. акад. с.-х. наук им. Ленина. Сиб. отд-ние. – Новосибирск, 1985. – Вып. 30. – С. 39-44.

138. *Мартма О.В.* Атипичные микобактерии и их диагностическое значение при туберкулезе крупного рогатого скота: автореф. дис. ... д-ра вет. наук / О.В. Мартма. – Тарту, 1971. – 483 с.

139. *Мартма О.В.* Выделение микобактерий из материала от крупного рогатого скота, не имеющего при вскрытии туберкулезных очагов / О.В. Мартма // Теоретические и практические вопросы ветеринарии / Эстон. НИИЖВ. – Тарту, 1974. – С. 119-122.

140. *Мартма О.В.* О течении микобактериозов крупного рогатого скота на некоторых фермах Эстонской ССР / О.В. Мартма // Сб. науч. тр. Эстон. НИИЖВ. – Тарту, 1986. – Вып. 57. – С. 25-32.

141. *Мартма О.В.* Современное состояние проблемы атипичных микобактерий в ветеринарии / О.В. Мартма // Ветеринария. – 1982. – №5. – С. 22-24.

142. *Мартма О.В.* Патогенность атипичных микобактерий для морских свинок / О.В. Мартма, Э.И. Тюри // Ветеринария. – 1968. – № 10. – С. 34-35.

143. *Мартма О.В.* О возбудителях и течении микобактериоза / О.В. Мартма, К.К. Тяхнас // Туберкулез крупного рогатого скота и меры борьбы с ним. – Новосибирск, 1986. – С. 96-100.

144. *Мартма О.В.* О значении микобактерий комплекса *avium-intracellulae* в этиологии микобактериоза крупного рогатого скота / О.В. Мартма, К.К. Тяхнас // Теоретические и практические вопросы ветеринарии: Материалы респ. конф. – Тарту, 1988. – Т. 2. – С. 21-22.

145. *Мартма О.В.* Парааллергические реакции на туберкулин и их дифференциация / О.В. Мартма, К.К. Тяхнас // Ветеринария. – 1978. – № 4. – С. 35-38.

146. *Мартма О.В.* Характеристика и патогенность для крупного рогатого скота микобактерий, выделенных из торфа / О.В. Мартма // Ветеринария. – 1967. – № 6. – С. 35-38.

147. *Материалы* к вопросу об изучении штаммов БК из различного патологического материала / С.И. Гельберг и др. // Борьба с туберкулезом. – 1935. – № 1. – С. 25-27.

148. *Месрбяну Л.* Физиология бактерий /Л. Месрбяну, Э. Пэунеску. – Бухарес, 1963. – 807 с.

149. *Методические* рекомендации по дифференциации микобактерий туберкулеза /разраб. Т.Е. Ильина; Минздрав РСФСР. НИИ туберкулеза. – М., 1980. – 24 с.

150. *Методические* рекомендации по дифференциации микобактерий туберкулеза /разраб. Т.Е. Ильина; Минздрав РСФСР. НИИ туберкулеза. – Л., 1975. – 21 с.

151. *Методические* указания по диагностике туберкулеза животных. – М., 1976. – 18 с.

152. *Методы* дифференциации атипичных штаммов микобактерий / М.М. Дыхно и др. // Тр. VII Всесоюз. съезда фтизиатров. – М., 1966. – С. 252-235.

153. *Методы* экспериментальной химиотерапии / под ред. Г.П. Першина. – М., 1971. – 540 с.

154. *Милько Е.С.* Естественная изменчивость некоторых сапрофитных микобактерий / Е.С. Милько // Микробиология. – 1978. – Т. 47, вып. 3. – С. 556-557.

155. *Милько Е.С.* Естественная изменчивость микобактерий и родственных им микроорганизмов / Е.С. Милько, Н.С. Егоров, Н.А. Обухова // Биологические науки. – 1980. – № 3. – С. 5-19.

156. *Михайлова Л.В.* К вопросу выделения атипичных микобактерий от больных туберкулезом и методах их первичной идентификации / Л.В. Михайлова // Сов. здравоохран. – Киргизия, 1973. – №4. – С. 53-55.

157. *Модель Л.М.* Биология и биохимия туберкулезных микобактерий / Л.М. Модель. – М., 1952. – С. 199-248.

158. *Модель Л.М.* Биология туберкулезных микобактерий и иммунология туберкулеза / Л.М. Модель. – М., 1958. – 315 с.

159. *Назаров Н.* Сенсibiliзирующая роль некоторых видов атипичных микобактерий и мероприятия при парааллергических реакциях у крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Н. Назаров. – Казань, 1983. – 19 с.

160. *Наставление* по диагностике туберкулеза животных. – М., 1986. – 43 с.

161. *Нелюбин В. П.* Метод флюоресцирующих антител для идентификации микобактерий / В.П. Нелюбин // Тр. ВНИИВС. – М., 1972. – Т. 43. – С. 3-7.

162. *Немсадзе М.Н.* Сопоставление липидных фракций, токсичности и вирулентности микобактерий туберкулеза, выделенных от больных, леченных антибактериальными препаратами / М.Н. Немсадзе // Пробл. туберкулеза. – 1971. – № 11. – С. 66-69.

163. *Нестеренко О.А.* Изоляция и дифференциация нокардиоподобных и коринеподобных бактерий / О.А. Нестеренко, Е.И. Квасников, Т.М. Ногина. – Киев, 1985. – 336 с.

164. *Нестеренко О.А.* Систематика нокардиоподоб-

ных и коринеподобных бактерий: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / О.А. Нестеренко. – Киев, 1982. – 49 с.

165. *Нестеренко О.А.* Систематика нокардиеподобных и коринеподобных бактерий / О.А. Нестеренко // Микробиология. – 1980. – Т. 49, № 6. – С. 952-960.

166. *Об унификации* микробиологических методов исследования при туберкулезе: приказ № 558 Минздрава СССР. – М., 1978. – 98 с.

167. *Овдиенко Н.П.* Дифференциация неспецифических реакций на туберкулин для млекопитающих у крупного рогатого скота / Н.П. Овдиенко, А.И. Козин, Г.И. Устинова // Материалы Всесоюз. конф. – Омск, 1980. – С. 116-119.

168. *Овдиенко Н.П.* Профилактика и ликвидация туберкулеза крупного рогатого скота / Н.П. Овдиенко // Ветеринария. – 1986. – №9. – С. 15-20.

169. *Одаренко К.И.* О некоторых вопросах микробиологии типовой принадлежности микобактерий и диагностики туберкулеза сельскохозяйственных животных Казахстана: автореф. дис. ... канд. вет. наук / К.И. Одаренко. – Фрунзе, 1964. – 28 с.

170. *Околелов В.И.* Идентификация микобактерий лазерной спектроскопией / В.И. Околелов, А.П. Татаринцов, Е.С. Мартынова и др. // Ветеринария. – 1991. – № 2. – С. 28-30.

171. *Опыт* коллективного изучения нетуберкулезных микобактерий / А.Г. Хоменко и др. // Пробл. туберкулеза. – 1981. – № 8. – С. 62-68.

172. *О роли* несменяемой подстилки в эпизоотологии пуллороза и туберкулеза кур / М.Т. Прокофьева и др. // Ветеринария. – 1960. – №5. – С. 28-33.

173. *Первичная* лекарственная устойчивость атипичных микобактерий, выделенных от крупного рогатого скота и объектов внешней среды / Л.Н. Рубцова и др. // Совершенствование ветеринарных мероприятий в борьбе с инфекционными болезнями сельскохозяйственных животных в Казахстане: сб. науч. тр. – Алма-Ата, 1981. – С. 33-37.

174. *Перегудов Е.А.* О морфологических, культураль-

ных, тинкториальных, некоторых биохимических свойствах и лекарственной устойчивости микобактерий торфа, пассажированных через организм животных / Е.А. Перегудов // Сб. тр. ВНИВИП. – 1976. – Вып. 11. – С. 133-138.

175. *Пинчук Л.М.* Идентификация микобактерий с применением метода газовой хроматографии жирных кислот / Л.М. Пинчук, А.Л. Лазовская // Вопросы взаимосвязи туберкулеза человека и животных. – Алма-Ата, 1981. – С. 148-156.

176. *Погуляева Л.В.* Выделение и характеристика атипичных микобактерий в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах / Л.В. Погуляева, Л.А. Ильиных // Методы диагностики и профилактики бруцеллеза и туберкулеза животных: сб. науч. тр. Всерос. акад. с.-х. наук им. Ленина. Всерос. НИИ бруцеллеза туберкулеза животных. – Омск, 1988. – С. 97-101.

177. *Поленска Е.* Опыт применения ниацинового теста для дифференциальной диагностики различных микобактерий / Е. Поленска, Р. Урбанчик, З. Шиманк, П. Краус // Пробл. туберкулеза. – 1962. – №2. – С. 93.

178. *Полетаев С.Д.* Атипичные микобактерии и микобактериозы / С.Д. Полетаев. – М., 1978. – 15 с.

179. *Полетаев С.Д.* Туберкулез и лепра / С.Д. Полетаев, В.Н. Погорелов. – М., 1986. – 125 с.

180. *Полякова О.А.* Туберкулез и паратуберкулез / О.А. Полякова // Рекомендации по экспресс-диагностике вирусных и бактериальных инфекций люминесцентной микроскопией. – М., 1969. – С. 39-40.

181. *Поспелов В.В.* Значение логической пробы в выявлении скрытого бактериовыделения в условиях химиотерапии / В.В. Поспелов, Ю.Н. Пашков, А.И. Лобченко // Пробл. туберкулеза. – 1982. – № 8. – С. 66.

182. *Прозоров А. А.* Изменения рН питательной среды при росте туберкулезной микобактерии и кислотоустойчивых сапрофитов / под ред. А.И. Струкова, М.Н. Лебедевой // Вопросы патологии туберкулеза и изменчивости его возбудителя. – М., 1956. – С. 166-173.

183. *Противотуберкулезные мероприятия при выделении атипичных микобактерий у крупного рогатого скота в хозяйствах северо-востока Казахстана* / В.С. Федосеев, И.Н. Рубцова Н.Н. Назаров, Т.М. Мусина // Вестн. с.-х. науки Казахстана. – 1979. – № 1. – С. 72-75.

184. *Рачкова О.Ф.* Экспресс-метод идентификации микобактерий / О.Ф. Рачкова, Л.М. Пинчук и др. // Ветеринария. – 1991. – №4. – С. 31-32.

185. *Рубцова И.Н.* Формы персистирования микобактерий в организме животных / И.Н. Рубцова, В.С. Федосеев, Н.Г. Кирилленко // Проблемы борьбы с болезнями жвачных животных в северных областях Казахстана: сб. науч. тр. – Целиноград, 1986. –Т. 68. – С. 9-15.

186. *Рудой Н.М.* Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза / Н.М. Рудой. – М., 1969. – 287 с.

187. *Савченко П.Е.* Атипичные микобактерии и их значение в патологии туберкулеза / П.Е. Савченко // Ветеринария. – Киев, 1974. – Вып. 39. – С. 6-7.

188. *Сапунджиева Е.* Эпидемиология атипичных микобактериозов. Серологическое типирование / Е. Сапунджиева // Епид. микр. и инф. б-ней. - София, 1972. – Т. 9, № 1. – С. 8-15.

189. *Сидоркина Э.В.* Сравнительная характеристика современных культуральных и биохимических методов типирования микобактерий туберкулеза: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Э.В. Сидоркина. – Алма-Ата, 1973. – 18 с.

190. *Скрябина Е.Л.* Способ отличия туберкулезных бактерий от кислотоустойчивых сапрофитов при бактериологическом исследовании / Е. Л. Скрябина // Пробл. туберкулеза – 1955. – № 4. – С. 63-68.

191. *Скрябин К. И.* Девастация в борьбе с гельминтозами и другими болезнями человека и животных / К.И. Скрябин. – Фрунзе, 1947. – 97 с.

192. *Совершенствование методов выделения и диагностики кислотоустойчивых микобактерий* / Н.М. Макаревич и др. // Методы и средства диагностики, терапии и про-

филактики инфекционных болезней животных: сб. науч. тр. всерос. ин-та эксперимент. ветеринарии. – М., 1985. – Вып. 63. – С. 26-31.

193. *Соколова А.С.* Интратестикулярный метод заражения морских свинок в биопrobe при диагностике туберкулеза / А.С. Соколова, Н.А. Иванова, Л.А. Красота // Бюл. Всерос. акад. с.-х. наук им. В.И. Ленина. – М., 1987. – Вып. 64. – С. 27-31.

194. *Соколова Н.М.* О двух методах типирования туберкулезных культур / Н.М. Соколова // Пробл. туберкулеза. – 1939. – №5. – С. 66-71.

195. *Солонеко А.А.* Влияние микобактерий из группы подобных возбудителю туберкулеза птичьего типа на организм свиней / А.А. Солонеко, В.Д. Ковальчук // Достижения ветеринарной науки и передового опыта – производству. – М., 1977. – Вып. 3. – С. 6-7.

196. *Солонеко А.А.* О кордообразовании у микобактерий, выделенных из организмов свиней, реагирующих на туберкулин / А.А. Солонеко, А.Н. Анищенко // Ветеринарная наука – производству. – Минск, 1972. – С. 34-58.

197. *Столызго Н.С.* Исследование потенциально патогенных свойств хромогенных мутантов микобактерий туберкулеза и некоторых атипичных микобактерий / Н.С. Столызго // Пробл. туберкулеза. – 1974. – № 8. – С. 73-78.

198. *Тарасевич Л.А.* Биология и морфология возбудителя туберкулеза / Л.А. Тарасевич // Русский архив патологии. – 1899. – №8. – С. 594-600.

199. *Татаринов А.Л.* Ультрафиолетовые резонансные спектры комбинационного рассеяния микобактерий туберкулеза / А.П. Татаринов, Е.С. Мартынова, В.И. Околелов // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 1990. – № 4. – С. 61-66.

200. *Ткачев-Кузьмин А.В.* Роль некоторых видов атипичных микобактерий в сенсibilизации животных к туберкулину / А.В. Ткачев-Кузьмин // Бюл. Всерос. ин-та эксперимент. ветеринарии. – М., 1983. – Вып. 51. – С. 50-53.

201. *Тогунова А.И.* Экспериментальные критерии

патогенности атипичных микобактерий / А.И. Тогунова, М.Л. Хатеневер // Пробл. туберкулеза. – 1967. – № 9. – С. 59-65.

202. *Тогунова А.И.* Значение проблемы так называемых атипичных, или анонимных микобактерий в патологии человека / А.И. Тогунова // Тр. VII Всесоюз. съезда фтизиатров. – М., 1966. – С. 521-525.

203. *Туберкулез органов дыхания: руководство для врачей* / А.Г. Хоменко и др.; под. ред. А.Г. Хоменко. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М., 1988. – 576 с.

204. *Тузова Р.В.* Экспериментальное изучение патогенности возбудителя туберкулеза птичьего типа для крупного рогатого скота / Р.В. Тузова // Борьба с потерями в животноводстве. – Минск, 1963. – С. 20-30.

205. *Тузова Р.В.* Туберкулез сельскохозяйственных животных и птицы / Р.В. Тузова. – Минск, 1983. – 263 с.

206. *Тырина В.С.* Сравнительное изучение различных групп кислотоустойчивых микобактерий и методов их дифференциации: автореф. дис. ... канд. вет. наук/В.С. Тырина. – М., 1969. – 19 с.

207. *Тюри Э.И.* Вирулентность фтиaziдоустойчивых и каталазоотрицательных штаммов микобактерий туберкулеза для морских свинок при интратестикулярном заражении / Э.И. Тюри, М.Э. Сильд // Пробл. туберкулеза. – 1964. – № 2. – С. 71-73.

208. *Тюри Э.И.* О применимости ниаинового теста с цианистым калием и хлорамином Б для идентификации микобактерий человеческого типа / Э.И. Тюри, М.Э. Тюри // Лаб. дело. – 1964. – № 7. – С. 392-394.

209. *Тюри Э.И.* Патогенность различных микобактерий для морских свинок при интратестикулярном и подкожном заражении / Э.И. Тюри, М.Э. Тюри // Пробл. туберкулеза. – 1964. – №10. – С. 74-76.

210. *Тяхнас К.К.* О встречаемости атипичных микобактерий при воспалении легких у телят / К.К. Тяхнас // Сб. науч. тр. Эст. НИИЖВ. – 1974. – № 32. — С. 21-25.

211. *Финкель Е.А.* Биологический метод исследований при туберкулезе / Е.А. Финкель, Л.В. Михайлова. – Фрунзе, 1976. – 556 с.

212. *Хазипов Н.Э.* Туберкулез крупного рогатого скота / Н.Э. Хазипов, М.А. Сафин, Г.З. Идрисов. – М., 1985. – 128 с.

213. *Харитонов М.В.* О дифференциации специфических реакций на туберкулин от неспецифических / М.В. Харитонов // Ветеринария. – 1983. – № 1. – С. 30-31.

214. *Харитонов М.В.* Этиология неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота / М.В. Харитонов // Сб. науч. тр. – Казань, 1985. – С. 15-17.

215. *Харитонов М.В.* Показатели аллергических реакций у морских свинок, сенсibilизированных различными микобактериями / М.В. Харитонов, М.А. Сафин // Разработка эффективных методов профилактики и лечения животных при инфекционных заболеваниях. – Казань, 1982. – С. 68-69.

216. *Юдин Г.А.* Роль непатогенных кислотоустойчивых микобактерий в диагностике туберкулеза крупного рогатого скота и некоторые методы их идентификации: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Г.А. Юдин. – М., 1966. – 18 с.

217. *Юдин Г.А.* Эпизоотологическое значение непатогенных микобактерий в диагностике туберкулеза крупного рогатого скота / Г.А. Юдин // Тр. Всерос. ин-та эксперимент. ветеринарии. – М., 1972. – Т. 40. – С. 328-334.

218. *Юдин Г.А.* Дифференциальная диагностика туберкулеза и ее экономическая эффективность / Г.А. Юдин, П.А. Чулков // Методы и средства диагностики, профилактики и лечения инфекционных болезней животных. – М., 1985. – С. 17-24.

219. *Allen W.* Storage of mycobacteria at - 20°C / W. Allen // Med. Lab. Sci. – 1986. – Vol. 43, № 4. – P. 390-392.

220. *Asselineau C.* Trehalose - containing glycolipids / C. Asselineau, J. Asselineau // Progr. Chem. Fats other Lipids. – 1978. – Vol. 16. – P. 59-99.

221. *Asselineau J.* Complex lipids of the cell envelope of

Actin-omycetes. / J. Asselineau, C. Asselineau // Actinomycetes – Stuttgart; New York, 1981. – P. 39-100.

222. *Beerwerth W.B.* Zur Okologie der Mikobakterien / W. Beerwerth // Zentral. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. – 1969. – Hyg. Abt. 1: Orig. 211. – P. 58-69.

223. *Beerwerth W.B.* Zur epizootologischen Bedeutung der Sage-mehleunstreu für das Auftreten der Selewernetuberkulose / W. Beerwerth, K. Popp // Zentralblatt für veterinärmedizinische Reihe B. – 1971. – Vol. 18. – P. 634-645.

224. *Beerwerth W.B.* Micobacteria in arthropodes of different biotypes / W.B. Beerwerth, B. Eising, U. Kessel // Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. – 1979. – Hyg. Abt. L.: Orig. Reihe. – A. 244. – P. 50-57.

225. *Bergey A.M.* Manual of Determinative Bacteriology. – Baltimore: Williams and Wilkins Co. – 1974. – 1246 p.

226. *Blacklock Z.M.* Atypical mycobacteria causing non-pulmonary disease in Queensland / Z.M. Blacklock, D.J. Dawson // Pathology. – 1979. – Vol. 11, №12.

227. *Bloch H.* Studies on the virulence of tubercle bacilli / H. Bloch // J. exper. med. – 1950. – Vol. 91, № 2.

228. *Bloch H.* A toxic lipid component of the tubercle bacilli (cord-factor). Isolation from petroleum ether extracts of young bacterial cultures / H. Bloch, E. Sorkin, P. Stermeyer // Amer. Rev. Tub. — 1953. – Vol. 67. – P. 629-633.

229. *Bojalil L.F.* Adansonian classification of mycobacteria / L.F. Bojalil, J. Cerbon, A. Trujillo // J. gen. Microbiol. – 1962. – Vol. 28. – P. 333-346.

230. *Bonicke R.* Über das Vorkommen von Acylamidasen in Mycobakterien / R. Bonicke, B. Lisboa // Bl. Bact. Y. Orig. – 1959. – B. 175. – P. 403-421.

231. *Buraczewska M.* Próby klasyfikacji i identyfikacji praktycznych atypowych / M. Buraczewska // Gruzlica. – 1963. – Vol. 31. – P. 748-749.

232. *Chapman J.S.* Le rôle du lait et du bétail dans l'épidémiologie des affections à mycobactéries atypiques / J.S. Chapman // Rev. Tuberc. et Pneumol. – 1970. – Vol. 34. – P. 17-24.

233. *Collins C.H.* Revised classification of anonymous mycobacteria / C.H. Collins // J. Clin. Path. – 1966. – Vol. 19. – P. 433-437.

234. *Collins C.H.* Unusual opportunist mycobacteria / C.H. Collins, J.M. Grange, M.D. Yates // Med. Lab. Sci. – 1986. – Vol. 43, № 3. – P.262-268.

235. *Cooperative* numerical analysis of rapidly growing mycobacteria / H. Saito et al. // The second report. Int. J. Syst. Bacteriol. – 1966. – Vol. 27. – P. 75-85.

236. *Corner L.A.* Pathogenicity for cattle of atypical mycobacteria isolated from feral pigs and cattle and correlation of lesions with tuberculin sensitivity / L.A. Corner, C.W. Pearson // Austral. Vet. journal. – 1978. – Vol. 54. – P. 280-286.

237. *Dubos R.* Cytochemical reaction of virulent tubercle bacilli / R. Dubos G. Middlebrook, // Am. Rev. Tubercle. – 1948. – Vol. 58, № 6. – P. 10-12.

238. *Frati M.A.C.* Las micobacterias atípicas en Mexico / M.A.C. Frati, C.R. Vargae, S.L. Vegara, S.S. Gonzales // Prensa Tied, tex. –1975. – Vol. 40, № 1, 2. – P. 11-15.

239. *Georg L.K.* The identification of *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* / L.K. Georg, L. Ajello, Me. C Durmont, T.S. Hosty // Amer. Rev. Respirat. Disease. – 1961. – Vol. 84, № 3. – P. 337-347.

240. *Goren M.B.* Some observations on mycobacterial acid-fastness / M.B. Goren, M. Cernich, O. Broki // Amer. Rev. Respirat. Disease. –1978. – Vol. 118, №1. –P. 151-154.

241. *Grange J.M.* Environmental mycobacteria and BCG vaccination / J.M. Grange // Tubercle. – 1986. – Vol. 67, № 1. – P. 1-4.

242. *Grange J.M.* Infections caused by opportunistic mycobacteria: a review / J.M. Grange, M.D. Yater // Int. J. Leprosy. – 1986. – Vol. 54, № 4. – P. 626-631.

243. *Growth* characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants / L.A. Carson et al. // Amer. Society for Microbiology. – 1978. – Vol. 36, № 6. – P. 839-846.

244. *Halabarder C.* The so-called problem of unclassified mycobacteria / C. Halabarder // Amer. Rev. Resp. Dis. – 1961. – Vol. 83, № 1. – P. 1-15.

245. *Hergt R.* Niazin test und Nikotinamidase test bei INH-resistenten Stämmen von Mycobakterium tuberculosis / R. Hergt, G. Ogbuoto, W. Nimmich // Z. Tuberk. – 1968. – Bd. 129. – P. 329-334.

246. *Hopwood D.A.* Molecular biology of mycobacteria / D.A. Hopwood, T. Kleser, M.J. Colston, F.I. Lamb // Brit. Med. Bull. – 1988. – Vol. 44, № 3. – P. 528-546.

247. *Ianowiec M.* Występowanie atypowych mykobakterii u chorych na gruźlicę w dobranych środowiskach w. 1972 / M. Ianowiec // Gruźlica. – 1973. – Vol. 41, № 12. – P. 1231-1240.

248. *Iaramillo V.L.* Recovery of Mycobacterium avium after treatment with chemical decontaminants / V.L. Iaramillo, Me. C. Carthy // Can. J. Microbiol. – 1986. – Vol. 32, № 9. – P. 728-732.

249. *Jenkins P.A.* The identification of mycobacteria met in clinical practice / P.A. Jenkins // Bull. Un. Int. Tuberc. – 1988. – Vol. 63, № 3. – P. 7-9.

250. *Kappler W.L.* Beitrag zur Arthestimmung von Mykobakterien / W.L. Kappler // Zeitschrift für Erkrankungen der Atmungsorgane. – 1971. – B. 135. – P. 39-51.

251. *Kappler W.L.* Identification et différenciation et la classification des Mycobactéries / W.L. Kappler // Bull. Un. Int. Tuberc. – 1966. – Vol. 38. – P. 49-51.

252. *Kappler W.L.* Pathogene Mykobakterien / W.L. Kappler // Z. Erkrank. Atm. org. – 1982. – № 158. – P. 117-124.

253. *Kappler W.L.* Present state of mycobacterial taxonomy / W.L. Kappler // Vortrag-Symposium über Ökologie und Taxonomie der Mykobakterien anlässlich des 100. Jahrestages der Entdeckung der Tuberkulose – Erreger. – Berlin, 1982. – S. 152-158.

254. *Kestle D.* Differential identification of mycobacteria. II. Subgroups of groups II and III (Runyon) with different clinical

cal significance / D. Kestle, V. Abolt, G. Kubica // Amer. Rev. Resp. Dis. – 1967. – Vol. 95. – P. 1041-1052.

255. *Konno K.* New chemical method to differentiate human type tubercle bacilli from other Mycobacteria / K. Konno // Science. – 1956. – Vol. 124. – P. 985.

256. *Konno K.* The metabolism of nicotinic acid in mycobacteria / K. Konno, R. Kurzmann, K. Bird // Amer. Rev. Tuberc. a Pulm. Dis. – 1957. – Vol. 75. – P. 529-538.

257. *Koumare B.* Study on nitrate reductase in mycobacteria / B. Koumare, H. David // Bull. Un. Int. Tuberc. – 1986. – Vol. 61, № 3. – P. 113-115.

258. *Krasnow J.* Microcolonial test for the recognition of virulent mycobacteria / J. Krasnow, L. Wayne, D.A. Salkin // Am. Rev. Tuberc. a Pulm. Dis. – 1955. – Vol. 71. – P. 3.

259. *Krebs A.* Ober die Brauchbarkeit des Niacintestes zur Differenzierung von Mykobakterien / A. Krebs, W. Kappler // Zeitschrift f. Tuberkulose. – 1964. – B. 121, № 3,4. – P. 172-176.

260. *Kubica G.P.* Numerical Taxonomy of Selected. Slowly Growing Mycobacteria / G.P. Kubica, V.A. Silcox, E. Hall // J. gen. Microbiol. – 1973. – Vol. 74. – P. 159-167.

261. *Kubica G.P.* The current nomenclature of the mycobacteria / G.P. Kubica // Bull. Int. Union Against Tuberc. – 1979. – Vol. 54, № 2. – P. 204-211.

262. *Lechevalier M.P.* Lipid composition in the classification of nocardiae and mycobacteria / M.P. Lechevalier, A.C. Horan, H. Lechevalier // J. Bacteriol. – 1971. – Vol. 105, № 1. – P. 313-318.

263. *Levi-Frebault V.* Mycolic acid analysis for clinical identification of Mycobacterium avium and related mycobacteria / V. Levi-Frebault, Gon Khyl-Seng, H.L. David // J. Clin. Microbiol. – 1986. – Vol. 24, №5. – P. 835-839.

264. *Levi-Frebault V.* Mycobacterium fallax sp. nov / V. Levi-Frebault, E. Rafidinarivo, I.C. Prome et al. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1983. – Vol. 33, № 2. – P. 336-343.

265: *Lohaj J.* Diferenciace mykobakterij mikrobiologickum pru-kazem kyseliny nikotinove / *J. Lokaj* // Rozhl. Tuberk. – 1963. – № 4. – P. 250-257.

266. *Maffucci A.* Beitrag zur Aethiologie der Tuberkulose (Huhnertuberkulose) / *A. Maffucci* // Cntralbl. f. allg. Path. u. path. Anat. – 1890. – B. 1, № 13. – P. 409-416.

267. *Magnusson M.* Mycobacterial Sensitins with particular emphasis on their use for identification of species *Mycobacterium* / *M. Magnusson* // *Z. Immunol. Forsch.* – 1969. – Vol. 137. – P. 177-181.

268. *Mandler F.* Classificazione dei micobatteri atipici in rapporto al loro significato clinico / *F. Mandler, L. Scapellato, M.C. Ragni-Poggi* // *Ann. med. Sondalo.* – 1973 (1975). – Vol. 21, № 3. – P. 161-167.

269. *Marks I.* A new practical classification of the mycobacteria / *I. Marks* // *J. Med. Microbiol.* – 1976. – Vol. 9, № 3. – P. 253-261.

270. *Masai H.* Nitrate-reduction Test of Mycobacteria by Mens of Test Paper / *H. Masai* // *Kekkaku.* – 1975. – Vol. 50 – P. 241-244.

271. *Medveczky E.* A micromethod for the routine differentiation of human tubercle bacilli from other mycobacteria in primary culture / *E. Medveczky* // *Amer. Rev. resp. dis.* – 1960. – Vol. 81, № 5. – P. 757-759.

272. *Meissner G.* Infection sources for diseases of man and domestic animals with stins of me *M. avium* group in tne G.F.R. / *G. Meissner, W. Anz* // *Atypical Mycobacteria.* – Budapest, 1973. – P. 233-237.

273. *Meissner G.* A cooperative numerical analysis of nonscoto -and nonphotochromogenic slowly growing mycobacteria / *G. Meissner, K.H. Schroder, G.E. Amadio et al.* // *J. Gen. Microbiol.* – 1974. – Vol. 83, №2. – P. 207-235.

274. *Middlebrook G.* Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli / *G. Middlebrook, R. Dubos, C. Pirce* // *Exper. med.* – 1947. – Vol. 86. – P. 175.

275. *Minnikin D.* Liopid composition in the classification and identification of acid fast bacteria / *D. Minnikin, M. Good-*

fellow // Microbiological classification and identification. – London, 1980. – P. 189-256.

276. *Mitze H.* Die Differenzierung von Bakterienspezies mit Hilfe elektrophoretischer Verfahren / H. Mitze // Fortschr. Veter. Med. – 1978. – № 28. – P. 237-251.

277. *Murohashi T.* Effect of ultraviolet irradiation of the acid-fastness of drug-resistant mutants of tubercle bacilli, with special reference to the virulence of isoniazid-resistant strains / T. Murohashi, K. Yoshida // Am. Resp. Dis. – 1968. – Vol. 97. – № 2. – P. 283.

278. *Neubert R.* Untersuchungen zum Resistenzverhalten atypischer Mykobakterien gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden / R. Neubert // Z. Erkr. Atm. – 1986. – B. 167, № 1, 2. – P. 47-51.

279. *Nocard E.* Sur la culture du bacille de la tuberculose / E. Nocard, E. Roux // Ann. Inst. Past. – 1887. – № 1. – P. 19.

280. *Pattyn S.* Strategia rutynowych identyfikacji atypowych mykobakterii / S. Pattyn // Zesz probl. Posterow. Nauk. Roln. – 1975. – № 5. – P. 555-564.

281. *Ohshima M.* Изучение теста на изучение термостабильности каталазы для быстрой и простой дифференциации микобактерий / M. Ohshima, Y. Okuyama // ЭИСЭИ КЭНСА: Jap. I. Med. Technol. – 1986. – Vol. 35, № 12. – P. 1641-1644.

282. *Oka S.* Biochemical classification of mycobacterium / S. Oka, A. Konno, H. Nagayama // Jap. Med. J. – 1961. – Vol. 1940. – P. 8-12.

283. *Pavlas M.* Katalazova aktivita M. avium a nonchromogen-nich mykobakterii intermediarni skupiny / M. Pavlas // Veter. Med. – 1973. – P. 677-683.

284. *Pavlas M.* Vyzman nekterych saprofytickych mykobakterii pri parrallergickych reakcich na savci tuderkulini u skotu. / M. Pavlas // Vedecke Prace. – Praha, 1965. – № 4. – P. 111-124.

285. *Portaels F.* Nocardia-like mycobacteria isolated from natural habitats in Zaire / F. Portaels, M. Goodfellow, D. Minnikin et al. // Ann. soc. helge med. trop. – 1981. – Vol. 61, № 3. – P. 477-487.

286. *Portaels F.* Evaluation des mycobacterioses a partir dun labora-toire de mycobacteriologie / F. Portaels, La place et al. // Bull. Union int. contre tuberc. et malad. respir. – 1988. – Vol. 63, № 4. – P. 14-17.

287. *Pryce D.* Slide method of diagnostic Mycobacteria Tuberculosis / D. Pryce // J. Path. a Bact. – 1941. – Vol. 53. – P. 327-334.

288. *Ratledge C.* Lipids: cell composition, fatty acid biosyntheses / C Ratledge // The biology of mycobacteria. – London, 1982. – Vol. 1. – P. 53-93.

289. *Ratledge C.* The Mycobacteria / C. Ratledge // Meadowfield press. –1977. – 130 p.

290. *Redmond W.B.* Methods for bacteriophage typing of mycobacteria / W.B. Redmond, J.H. Botes, H.W. Engel // Meth. Microbiol. – London, 1979. – Vol. 13. – P. 345-375.

291. *Rees R.J.* Gross reactions between mycobacterium antigens. // International symposium on «Tuberculin, mycobacterial antigens, immunity to tuberculosis» / R.J. Rees. – Siena, Italy, 1971. – S. 345-375.

292. *Relationship* between serotype and certain biological and biochemical characteristics of strains tne Mycobacterium avium and Mycobacteria intracellulare complex / M. Tsukamura et al. // Microbiol. Immunol. – 1982. – Vol. 26. – P. 871-875.

293. *Richmond L.* Методы оценки вирулентности кислотоустойчивых бацилл / L. Richmond, M. Cummings // Сборник сокращенных переводов и рефератов иностранной литературы. – М., 1951. – С. 632-637.

294. *Ryter A.* Etude an microscope electronique de plasmas con-tenant de I. acide desoxyribonuclei que. J Les nucleades des bacteries en croissance active / A. Ryter, E. Kellenberger // Z. Naturforsch. – 1958. – B. 13. – P. 597-599.

295. *Rivolta-Sulfa.* Tuberculosi degli uccelli // Giorn. di Anatomia e Fisiologia. – 1889. – P. 22.

296. *Runyon E.H.* Anonymous mycobacteria in pulmonary diseases / E.H. Runyon // Med. Clin. N. Amer. – 1959. – Vol. 43, № 1. – P. 273-290.

297. *Runyon E.H.* Identification of acid fast pathogens. Utilizind Microcolony characteristics. Brochure Vet. Admin.

Hosp. and Univers of Utan Salt Like City Utah. 3 Ed. / E.H. Runyon. – 1972. – 32 p.

298. *Runyon E.H.* Names for tubercle bacilli, the status of BGG / E.H. Runyon // Amer. Rev. Respirat. Disease. – 1975. – Vol. 111, № 2. – P. 239.

299. *Runyon E.H.* Ten mycobacterial phatogen / E.H. Runyon // Tubercle. – 1974. – Vol. 55, № 3. – P. 235-240.

300. *Saito H.* Serological studies of avian-group III non-photo-chromogen complex by agglutination test / H. Saito // Amer. Rev. Resp. Dis. – 1968. – Vol. 97. – P. 47-59.

301. *Schafer W.* Incidence of serotypes of *M. avium* and atypical Mycobacteria in human and animals disease / W. Schafer // Amer. Rev. Resp. Dis. – 1968. – Vol. 97, № 1. – P. 18-23.

302. *Schafer W.* Serological identification of the atypical mycobacteria and its value in epidemiologic studies / W. Schafer // Amer. Rev. Resp. Dis. – 1967. – Vol. 96, № 1. – P. 115-118.

303. *Schultre W.D.* Characterization and identification of Mycobacterium smegmatis in bovine mastitis / W.D. Schultre, W.B. Brasso // Am. J. Vet. Res. - 1987. – Vol. 48, № 5. – P. 739-742.

304. *Silcox V.A.* Identification and Clinical Significance of Rapidey Growind Mycobacteria / V.A. Silcox, R.C. Coad, M.M. Floud // Abstr. 79-th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. – Los Angelas, 1979; Washington, 1979. – P. 318.

305. *Smith T.* A comparative study of bovine tubercle bacilli and of human bacilli from sputum / T. Smith // J. Ex. Med. – 1898. – Vol. 3. – P. 45-60. (Tsukamura, 1972). Sp. nov. nom. rev. / M. Tsukamura // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1981. – Vol. 31. – № 3. – P. 247-258.

319. *Tsukamura M.* Numerical classification of 280 Strains of slowly growing mycobacteria / M. Tsukamura // Microbiol. and Immunol. – 1983. – Vol. 27, № 4. – P. 315-334.

320. *Tsukamura M.* Numerical classification of slowly growing mycobacteria / M. Tsukamura // Ibid. – 1976. – Vol. 26, № 4. – P. 409-420.

321. *Tsukamura M.* Source and infection route to humans

of pathogenic mycobacteria other than tubercle bacilli / M. Tsukamura // Kekkaku. – 1976. – Vol. 52, № 6. – P. 261-267.

322. *Tsukamura M.* Numerical classification of rapidly growing nonphotochromogenic mycobacteria / M. Tsukamura, S. Ichiyama // Microbiol. and Immunolog. – 1986. – Vol. 30. – P. 863-882.

323. *Tsukamura M.* Numerical analysis of relationship among rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria / M. Tsukamura, S. Mizuno // J. Gen. Microbiol. – 1977. – Vol. 98, № 2. – P. 511-517.

324. *Tsukamura M.* Thin-layer chromatography of sulfolipids as an aid to classification and identification of rapidly growing nonphotochromogenic mycobacteria / M. Tsukamura, S. Mizuno // Microbiol. and Immunol. – 1981. – Vol. 25, № 1. – P. 75-77.

325. *Virtanen S.* The occurrence of atypical acid-fast bacilli in human faeces / S. Virtanen // Ann. Med. Exp. Fenn. – 1963. – № 3. – P. 425-429.

326. *Wayne L.G.* Differentiation of Mycobacteria by their effect on Tween-80 / L.G. Wayne // Amer. Rev. resp. Dis. – 1962. – Vol. 86. – P. 579-581.

327. *Wayne L.G.* Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus Mycobacterium: tests for niacin and catalase for resistance to isoniazid, thiophene 2-carboxylic acid hydrazide, hydroxyl-amine and p-nitrobenzoate / L.G. Wayne, H.W. Engel, C. Grassi, W. Gross et al. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1976. – Vol. 26, № 3. – P. 311-318.

328. *Wayne L.G.* Таксономические и генетические аспекты мирового распространения атипичных микобактерий / L.G. Wayne // Тр. XXI Междунар. конф. по туберкулезу. – М., 1971. – С. 145-147.

329. *Wayne L.G.* Classification and identification of mycobacteria / L.G. Wayne, J.R. Dubek, G.A. Dias // Amer. Rev. Resp. Dis. – 1967. – Vol. 96. – P. 88-95.

330. *Woods G.L.* Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis: Review of Microbiologic and Clinical aspects / G.L. Woods, J.A. Washington // Rev. Infect. Dis. – 1987. – Vol. 9, № 2. – P. 275-294.

ЧАСТЬ 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Значение молекулярных подходов определяется тем, что они, во-первых, предоставляют наиболее точные из возможных средств слежения за распространением возбудителя; во-вторых, позволяют отслеживать изменения в биологически важных участках генетического материала возбудителя туберкулёза, происходящие в процессе взаимодействия инфекционного агента с организмом чувствительного хозяина и со средой; в-третьих, способствуют описанию структуры популяции возбудителя и позволяют выявлять протекающие во времени изменения в популяционной структуре, которые могут вызвать эпизоотию.

Развитие молекулярной биологии в последние годы позволило значительно повысить эффективность индикации микобактерий туберкулёза в крови, биоматериале и культуре, выросшей на питательной среде, плевральной жидкости, мокроте, моче, ликворе, периферической крови, биопсийном материале, парафинированных тканях (Вишневский, 1998; Владимирский, 2003; Persing, 1991).

Базовым методом молекулярно-генетических исследований являются диагностические тест-системы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Шаров, 1998, 2000; Глик и др., 2002; Cousins et al., 1998; Saiki, 1985; Mullis, Faloona, 1987; Saiki et al., 1988), направленные на выявление ДНК микобактерий туберкулёза в диагностическом материале (Лазовская и др., 2004; Майорова и др., 2004; Калмыкова, 2007; Public ... , 1985). В настоящее время в ветеринарных лабораториях применяют ПЦР-тест-системы четырёх производителей, в том числе три комплексные для выявления ДНК *M. bovis* и *M. tuberculosis* производства

ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦНИИЭ), ЗАО «ЛАГИС», ООО «Компания «БИОКОМ» и одну дифференцирующую *M. bovis* от *M. tuberculosis* производства НПО «НАРВАК». Для выявления ДНК *M. avium* используют тест-систему «АВИУМ» производства ЦНИИЭ (Владимирский, 2003; Шаров, 2003; Калмыкова, 2007).

Достоинства генодиагностики заключаются в высокой специфичности, быстром получении результатов анализа и возможности обнаружения единичных микобактериальных клеток в клиническом биоматериале (Аксёнов, Гинзбург, 1993; Блум, 2002; Борисова и др., 2004; Гребенникова и др., 2004; Корнева, Демкин, 2004; Розанцев, 1991; Lassence, 1992). ПЦР даёт возможность диагностировать не только острые, но и латентные формы инфекции (Панин и др., 1999; Жуховицкий, 2000). Метод особенно актуален для диагностики туберкулёза, поскольку эффективен в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью (в том числе L-форм), определение которых требует длительного культивирования или сложных питательных сред, а также внутриклеточных паразитов и персистирующих микроорганизмов (Аксёнов, Гинзбург, 1993; Patel et al., 1990; Altamirano et al., 1992; Soini et al., 1992; Victor et al., 1992). Наряду с этим метод ПЦР перспективен при проведении межвидовой и штаммовой идентификации туберкулёзных и нетуберкулёзных микобактерий (Лазовская и др., 2004).

Для выявления ДНК микобактерий туберкулёза в пробах используют различные праймеры. Одни направлены на амплификацию фрагментов ДНК генов, кодирующих микобактериальные антигены; другие – на амплификацию повторяемых последовательностей у микобактерий туберкулёзного комплекса; третьи – на амплификацию рибосомальной РНК (Хазипов, Аскарова, 2002).

Таким образом, достижения современной биотехнологии позволяют, используя молекулярно-генетические подходы, разрабатывать сверхчувствительные способы диагностики инфекционных болезней человека и животных, в том числе туберкулёза крупного рогатого скота.

Использование генетических методов для типирования и идентификации микробов расширило возможности молекулярной микробиологии. Общим для амплификационных технологий является использование в качестве мишени уникальных для того или иного вида возбудителей участков генетического материала (ДНК/РНК), что даёт высокую специфичность, а также экспоненциальный характер накопления продуктов реакции, обеспечивающий высокую чувствительность (Черноусова и др., 2001; Гуцин и др., 2005). Сегодня общепринятыми стали классификация бактериальной флоры на основании особенностей генов 16S рРНК, типирование штаммов микроорганизмов путём анализа особенностей их геномов (Pao et al., 1990; Hall et al., 2003). Применительно к бактериям речь идёт о типировании мультилокусным секвенированием генов жизнеобеспечения бактериальной клетки (MLST, multi locus sequencing typing), анализе числа повторяющихся мотивов в геноме (VNTR, variation number tandem repeats), обнаружении генетических маркеров резистентности к антибактериальным препаратам (Adekambi et al., 2006; Allix et al., 2006; Gopaul et al., 2006), благодаря чему становится возможным получение молекулярного паспорта конкретного микроба, отражающего его основные фенотипические характеристики (Ильина, 2004), а также выявляются очаги и прослеживаются пути распространения туберкулезной инфекции (Черноусова и др., 2001; Patel et al., 1990; Savelkoul et al., 1999; Swaminathan, Matar, 1993; Ralph, McClland, 1998; Ridley, 1998).

Применение молекулярно-биологических технологий позволяет на качественно новом уровне подойти к решению проблем диагностики, лечения и профилактики инфекционных заболеваний (Бравве и др., 2005).

Базовым методом молекулярно-генетических исследований является полимеразная цепная реакция, направленная на выявление ДНК микобактерий в диагностическом материале и потенциально способная обнаруживать единичные бактериальные частицы (Маниатис и др., 1984; Иванова,

Лазарева, 1998; Черноусова и др., 2001; Корнева, Демкин, 2004).

ПЦР – селективная амплификация (фактически клонирование) некоего фрагмента ДНК *in vitro*. Являясь самым чувствительным на сегодняшний день методом обнаружения инфекционных агентов (Маянский, 2000; Момыналиев, Говорун, 2000), ПЦР не требует иммунологического ответа на проникновение возбудителя в организм хозяина, что даёт возможность выявить заболевание на ранних стадиях.

Специфичность ПЦР и количество амплифицируемой ДНК, которое определяет чувствительность, могут значительно варьировать в зависимости от концентрации и качества 5 основных компонентов реакционной смеси (ДНК-матрицы, Taq-полимеразы, праймеров, dNTP и ионов Mg) и температурного режима ПЦР.

Неспецифичность ПЦР-амплификации повышается при снижении температуры отжига ниже оптимальной и при повышении концентраций праймеров и dNTP выше оптимальных, а при повышении температуры отжига выше оптимальной снижается выход специфической амплифицируемой ДНК вплоть до её полного исчезновения.

Принцип метода основан на энзиматической амплификации специфических участков ДНК.

Цикл репликации включает в себя три основные стадии:

- 1) расплетение спирали ДНК и расхождение нитей (денатурация);
- 2) присоединение праймеров;
- 3) достраивание дочерней цепи.

Присоединившиеся праймеры формируют стартовые блоки, с которых начинается синтез ДНК. Комплементарное достраивание нитей ДНК всегда протекает только в направлении от 5'-конца к 3'-концу нити ДНК и происходит в противоположных друг другу направлениях. Образовавшиеся в первом цикле амплификации продукты синтеза служат матрицами для второго цикла амплификации, в результате

которого, собственно, и происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК. Начиная с третьего цикла амплификации, вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле – это и есть цепная реакция в ПЦР (Ладыгина и др., 2001).

Подбор праймеров – ключевое звено ПЦР, поскольку именно ими определяется возможность амплификации и выявления нужной последовательности, а также чрезвычайная гибкость метода. Простое варьирование праймеров позволяет выявлять многие патогенные организмы при минимальных изменениях в методике (Шибата, 1999).

Для разработки праймеров требуется подобрать такой фрагмент молекулы ДНК, который бы отличался генетической консервативностью и присутствовал бы только у интересующего вида микроорганизмов или в исследуемом гене (Аляпкина, 1994; Хазипов, Аскарова, 2002; Shinnick, 1987).

Синтез праймеров не представляет технической сложности и осуществляется в автоматических синтезаторах.

В последние 20 лет были разработаны подходы к типированию, основанные на штаммовых различиях микобактериальных геномов. Метод фагового типирования применялся для анализа штаммов *M. tuberculosis*. Основным ограничением этого метода являлась малая специфичность и значительная трудоёмкость. В 1984 г. для штаммового типирования была предпринята техника рестрикционного анализа. Улучшенный вариант этого подхода позволял различать все 4 вида микобактерий туберкулёзного комплекса друг от друга и от *M. bovis* BCG. Тем не менее он не получил широкого распространения из-за трудностей, возникающих при фракционировании большого числа фрагментов. Новые варианты этого подхода с использованием пульс-электрофореза или расщепления микобактериальной ДНК мелкоцепящими рестриктазами также не получили широкого признания.

В 1989 г. были предложены новые методы геномной

дактилоскопии микобактерий (фингерпринтинга), основанные на детекции в геномах микобактерий различных повторяющихся нуклеотидных последовательностей, анализе полиморфизма длины фрагментов рестрикции (ПДРФ).

Другой подход, позволяющий осуществить дифференциацию штаммов микобактерий, базируется на применении Саузерн-блот гибридизации (Huang et al., 1991). В качестве зондов используются ряд инсерционных элементов – IS6110, большой полиморфный тандем повторяющихся последовательностей (MPTR), полиморфная G – C-обогащённая повторяющаяся последовательность (PGRS), олигонуклеотид (GTG)₅ (Шемякин и др., 2003; Ablordey, 2005).

Метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (геномная дактилоскопия) с использованием гибридного зонда на инсерционную последовательность IS6110 (IS6110-RFLP) является своеобразным «золотым стандартом» методов типирования клинических изолятов *M. tuberculosis* и обязательным референтным методом в случае выявления новых вариантов генотипов (Bifoni et al., 2002; Blackwood et al., 2004). Данные мигрирующие элементы характерны только для видов микобактерий группы туберкулеза и присутствуют в геноме микобактерий в числе нескольких копий. Пластичность генома бактерий не исключает вероятности того, что изменение расположения инсерционной последовательности в микобактериальном геноме может явиться причиной клональной экспансии определённого штамма *M. tuberculosis* и стать признаком, ассоциирующимся с клиническим проявлением туберкулёза (Чередник и др., 2005). Дискриминирующая способность IS6110-RFLP выше методов сполиготипирования и ETR-VNTR-типирования и составляет 99%, а воспроизводимость – 100%. Стандартизация метода позволяет сравнивать ДНК-отпечатки между отдельными лабораториями и создавать базы данных IS6110-RFLP генотипов микобактерий (Bifoni et al., 2002; Blackwood et al., 2004).

Метод MIRU-VNTR-генотипирования, предложенный

как альтернатива IS6110-RFLP для глобальной инвентаризации *M. tuberculosis complex* и мониторинга за эпидемиологическим процессом, позволяет различать определённые семейства штаммов внутри комплекса туберкулёзных микобактерий, существенно отличающихся фенотипическими свойствами и выделенных на относительно небольших территориях.

Чрезвычайно важной является возможность выявления клонально-связанных высокопатогенных полиантибиотикоустойчивых микроорганизмов, например играющих ведущую роль в развитии ряда эпидемических вспышек представителей семейства Beijing (Bifoni et al., 1996; Agerton et al., 1999; Supply et al., 2000; Banu et al., 2004).

VNTR-типирование с использованием локусов тандемных повторов в геноме микобактерий туберкулёзного комплекса, широко применяемое для выявления лабораторной кросс-контаминации, дифференциальной диагностики реинфекции и реактивации, позволяет оперативно диагностировать изменения генотипа инфицирующих штаммов, вносить коррективы в схему противотуберкулёзной терапии (Сурикова и др., 2005).

Геном *M. tuberculosis* составляет 4411529 п.н. Каждый нуклеотид содержит одно из четырех азотистых оснований – А, С, G или Т, составляющих тот алфавит, с помощью которого записывается генетическая информация в молекуле ДНК. Основания одной цепи ДНК спариваются с основаниями другой цепи по строго определенным правилам (А образует пару с Т, G – с С), поэтому достаточно определить последовательность оснований в одной из них.

Чтобы идентифицировать конкретное основание в какой-то области генома, необходим сенсор, способный заметить субнанометровое различие между А, Т, G и С. Единственный физический метод, обладающий столь высокой разрешающей способностью, – сканирующая туннельная спектроскопия. Однако при секвенировании последовательностей длиной в миллиарды звеньев чаще всего использу-

ются не физические, а химические способы. При методе Сэнгера секвенированию предшествует разрезание исследуемой молекулы ДНК на фрагменты, клонирование их в *E. coli* и многократная дупликация для получения миллионов копий каждого фрагмента. В результате последнего раунда дупликации, проводимого в особых условиях, получают набор копий фрагментов разной длины, каждый из которых заканчивается флуоресцентно меченым нуклеотидом. Фрагменты разделяют по длине с помощью электрофореза, регистрируют световой сигнал от каждого из них по мере прохождения через детектор и получают нуклеотидную последовательность исходной цепи.

Многие исследовательские группы положили в основу своих разработок биосинтез – процесс, который используют живые организмы при воспроизведении своего генома и устранении в нем повреждений. Так, в клетке, готовящейся к делению, двойная спираль ДНК расплетается, составляющие ее цепи расходятся, а затем на каждой из них синтезируется новая цепь (на одной – непрерывно, на другой – прерывисто, с образованием отдельных фрагментов). Процесс последовательного присоединения нуклеотидов к растущей цепи катализируется особым ферментом – ДНК-полимеразой. Другой фермент, лигаза, сшивает фрагменты. В результате образуются две новые полноразмерные полинуклеотидные цепи, комплементарные тем ДНК-матрицам, на которых они синтезировались.

Методы секвенирования при помощи биосинтеза берут за основу те стадии упомянутого процесса, которые протекают на одиночной цепи секвенируемой ДНК. Регистрируется момент присоединения к праймеру, гибридизовавшемуся с ДНК-матрицей, комплементарного нуклеотида (удлинение цепи), или момент сшивания лигазой праймера с олигонуклеотидным зондом, содержащего известный нуклеотид в определенной позиции.

Существуют разные способы регистрации данных процессов, но обычно используется один из двух типов сиг-

налов. Если меткой служит присоединенный к нуклеотиду флуорофор, то регистрируется испускаемый им свет определенной длины волны. Флуоресцентное детектирование применяют при секвенировании как методом удлинения цепи, так и методом лигирования. Другой подход основан на регистрации биолуминесценции, которая инициируется связыванием с белком люциферазой пиррофосфата, высвобождаемого после присоединения к праймеру очередного нуклеотида.

При детектировании флуоресценции одной молекулы 5% сигналов не улавливается, и, чтобы ликвидировать возникающие в результате пробелы в последовательности, приходится проводить считывание несколько раз. По этой причине многие предпочитают вначале амплифицировать секвенируемую цепь ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Здесь тоже разработан целый ряд новых подходов, позволяющих обойтись без предварительного клонирования ДНК в бактериальных клетках (<http://www.cbio.ru/>).

Для видовой идентификации микобактерий используется секвенирование амплифицированных фрагментов гена, кодирующего синтез 16 S рРНК (Майорова и др., 2004). Гены 16 S рРНК содержат разные функциональные зоны, которые имеют различную степень консерватизма, сохраняющегося в процессе секвенирования нуклеиновых кислот, и обеспечивающие видовую дифференциацию. Применение секвенирования нуклеиновых кислот для идентификации клинических изолятов позволило открыть несколько новых, ещё неизвестных патогенных видов микобактерий, таких как *M. interjectum* и *M. intermedium*. Секвенирование гена 16 S рРНК может быть использовано при крайне скудном росте культуры, когда применение биохимических методов невозможно (Springer et al., 1993).

Филогенетический анализ молекулярных данных является одним из подходов к теоретическому изучению структуры и функции генетических макромолекул (РНК,

ДНК, белков) и их эволюционного преобразования (замен нуклеотидов, делеций и вставок).

Основным инструментом филогенетического анализа является сравнение близких по структуре или по функции генов или белков и, прежде всего, сравнение их первичных последовательностей. Важнейшим свойством функционально значимых структур макромолекул является их эволюционный консерватизм. Чем меньше функциональная важность отдельных участков генов, тем больше они имеют тенденцию к эволюционной изменчивости. Консервативность генов позволяет выявить отдалённое родство между их представителями, давно разошедшимися в ходе эволюции и выполняющими иногда разные функции. Однако для филогенетического анализа необходимо и наличие определённого уровня изменчивости генов. Мутации, делеции и вставки являются своего рода метками, благодаря которым удаётся восстановить пути эволюции современных макромолекул. Сильно консервативные гены и их продукты нельзя, например, использовать для исследования эволюции отрядов и более мелких таксонов, но с успехом можно применять для изучения более крупных таксонов. Сильно переменчивые гены, наоборот, дают хорошее разрешение на поздних эволюционных этапах.

Для более удобной визуализации филогенетического положения видов используют построение дендрограмм. В качестве информации используется нуклеотидная последовательность консервативных генов. Положение видов на дендрограмме может отражать, с одной стороны, генетическое расстояние между объектами (в нуклеотидах), а с другой стороны – вероятностную принадлежность вида к определённой таксономической группе. Методы построения филогений многочисленны и разнообразны. Популярная схема классификации филогенетических методов разделяет их по способу использования данных на дистантные (начинают процесс создания дерева с вычисления матрицы генетических расстояний) и недистантные (не исследуется матрица

расстояний, а из исходных данных отбираются признаки, которые имеют разные состояния в разных OUT – операциональных таксономических единицах (operational taxonomic unit).

При сравнении различных подходов к классификации существенным преимуществом филогенетического анализа является то, что последний включает в себя не только методы построения дендрограмм, но также статистические методы оценки надёжности построения (Felsenstein, 1985; Rzhetsky, Nei, 1992). Статистические тесты, используемые в филогенетическом анализе, бывают двух видов: для сравнения филогенетических гипотез и для оценки стабильности группирования таксонов в пределах одной и той же дендрограммы. К первой группе методов относятся тесты, основанные на сравнении величин функции правдоподобия, вычисленных для каждой из сравниваемых дендрограмм. Наиболее универсальным методом в данной группе является тест Шимодейра-Хасегавы (Shimodaira, Hasegawa, 1999). В данном и подобным ему тестам величина функции правдоподобия вычисляется для всей дендрограммы (т.е. тест даёт оценку топологии в целом). Другой подход заключается в оценке статистической достоверности локальной топологии – для каждой внутренней ветви или узла дендрограммы оценивается параметр, имеющий смысл доверительной вероятности. Для исследования надёжности локальной топологии в дендрограмме можно использовать:

1. Тест на стандартную ошибку длин ветвей (Rzhetsky, Nei, 1992). В этом методе для каждой внутренней ветви дендрограммы вычисляется её длина и доверительный интервал для длины (для исследования дендрограмм, полученных дистантными методами, а также для МЕ-деревьев).

2. Бутстреп (bootstrap) – метод, предполагающий имитационное моделирование процесса сбора данных (Felsenstein, 1985). Процедура обычного (непараметрического) бутстрепа заключается в генерации из исходного элайнмента с помощью процедуры выборки с замещением

новых элайнментов (т.н. реплик), причём в каждой реплике одни столбцы исходного элайнмента дублированы, а другие могут отсутствовать. Далее для каждой реплики строится собственная дендрограмма. Полученные дендрограммы объединяются в одно консенсусное дерево, для узлов которого рассчитывается т.н. индекс поддержки (бутстрепный индекс, bootstrap confidence level). Значение индекса >70% для узла дерева принято считать признаком достоверной монофилии клады, для которой данный узел является наиболее близким общим предком (Hillis, Bull, 1993).

1.1. Особенности молекулярного строения и функционирования микобактерий

Геном *M. tuberculosis* расшифрован на примере лабораторного штамма H₃₇R_v (Cole, Barrell, 1998) и составляет 4411529 п.н., 65% которых составляют гуанин и цитозин, что соответствующим образом отражается на аминокислотном составе бактериальных белков, которые в свою очередь определяют специфические особенности заболевания. Геном представлен 4056 генами (91% общей ёмкости генома) 11 функциональных категорий. На сегодняшний день определены функции 52% генов. Особенностью *M. tuberculosis* является то, что экспрессируемые белки 6% всех генов генома вовлечены в метаболизм липидов. Имеются два гена, которые кодируют гемоглобинподобные белки, играющие роль антиоокислительных протекторов или ловушек избытка клеточного кислорода. Эти особенности способствуют быстрой адаптации туберкулёзных бацилл к резким изменениям окружающей среды. Ещё одна особенность генома *M. tuberculosis* заключается в наличии большого количества генов (4,2% всех генов генома), кодирующих белки двух больших семейств: PE и PPE, предположительно, поверхностных антигенов, характеризующихся высокой вариабельностью. Функциональные компоненты РНК кодируют 60 генов: уникальный рибосомальный РНК-оперон, 10

3a РНК, участвующий в деградации белков с нетипичной матричной РНК, РНК-компонент фермента РНК-азы Р, а также 45 транспортных РНК. Причиной медленного роста микобактерий на искусственных средах, вероятно, служит необычайно большое расстояние между оперонами *gtp* и сайтами репликации *oriC*. Гены, кодирующие тРНК, которые узнают 43 из 61 возможных смысловых кодонов, распределены по всему геному. Ни одна из многочисленных тРНК туберкулёза не узнаёт аденин в первой позиции антикодона, что в конечном итоге влияет на ход трансляции.

Отличительной особенностью микобактерий туберкулёзного комплекса является значительное сходство геномов – более 99% (Cole, Barrell, 1998), при сравнительном анализе 275 п.н. фрагмента спейсерной области 16S и 23S рибосомальной ДНК выявляется полное совпадение последовательностей (Frothingham et al., 1994). А.А. Майоровой и др. (2004) отмечено, что в хромосоме быстрорастущих микобактерий (*M. smegmatis*, *M. fortuitum*) находится две копии рДНК, а в хромосоме медленно растущих микобактерий (*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. ulcerans*, *M. kansasii*, *M. gordonae*) – одна копия.

Анализ последовательностей 56 структурных генов у нескольких сотен филогенетически и географически различных штаммов комплекса микобактерий туберкулёза обнаружил экстремально редкий аллельный полиморфизм (Kapur et al., 1994; Musser et al., 2000; Sreevatsan et al., 1997). Тем не менее микобактерии отличаются фенотипическими свойствами, кругом хозяев, вирулентностью, патогенностью для человека и для того или иного вида животных, несмотря на высокую генетическую однородность с уровнем синонимичных единичных нуклеотидных замен (sSNPs) 0,01-0,03% (Cole, Barrell, 1998; Fleischmann et al., 2002) и несущественным горизонтальным переносом генов. Основным источником генетического разнообразия у микобактерий служат мобильные элементы, делеции, варьирующие множественные повторы ДНК, точечные мутации (Cole et al., 1998; Hermans et al., 1991).

Устойчивость бактериальных клеток к лизису в культуральной среде определяют две профаговые последовательности. Бактериальная клетка синтезирует все необходимые для своего обмена компоненты – незаменимые аминокислоты, витамины, ферменты и кофакторы. В её геноме представлены гены самых разных ферментов: липидного обмена, гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного пути (http://www.mirrabort.com/work/work_69223.html).

1.2. Мобильные элементы генома микобактерий

Впервые IS-элементы микобактерий были обнаружены во время поиска штаммспецифических зондов для патогенных микобактерий методом дифференциальной гибридизации. Первыми из таких элементов были описаны IS900, позволившие провести сравнение *M. paratuberculosis* и изолятов от больных с болезнью Крона с штаммами *M. avium complex* (McFadden et al., 1987), а также IS6110 из *M. tuberculosis*, обнаруженный при поиске специфических или повторяющихся последовательностей ДНК, пригодных в качестве диагностических зондов (Eisenach et al., 1988; Thierry et al., 1990). В дальнейшем IS-элементы микобактерий клонировали, используя комбинацию методов «активного преследования», гибридизации с маркерами лекарственной устойчивости (Martin et al., 1990) и транспозонных ловушек в *M. smegmatis* (Cirillo et al., 1991).

В основном инсерционные элементы удаётся классифицировать по известным семействам мобильных элементов эубактерий. Большинство IS-элементов видоспецифичны либо имеются у ограниченного спектра хозяев, а Tn610 из *M. fortuitum* был обнаружен только в данном конкретном изоляте. Это позволяет использовать некоторые из мобильных элементов в качестве генных зондов для типирования видов, как это делается на других бактериях (Van der Zee et al., 1993).

1.2.1. Инсерции *M. paratuberculosis*, *M. avium* и *M. intracellulareae*: IS900, IS901 и IS1141

IS900 была выделена из библиотек ДНК *M. paratuberculosis* (Green et al., 1989). Её размер – 1451 пара оснований. Она не имеет ни инвертированных повторов на концах, ни прямых фланкирующих повторов вокруг основного элемента, копирующих акцепторную последовательность. IS900 имеет одну основную открытую рамку считывания (ОРС), обладающую сходством с транспозонами в составе инсерций IS110 и IS116 из *Streptomyces* spp. (Leskiw et al., 1990).

Анализ последовательностей, окружающих разные копии IS900, выявил сходство между инсерционными сайтами данного элемента. Общей для инсерционных сайтов является последовательность CATGN₍₄₋₆₎*CNCCTT (звёздочкой обозначен сам сайт). Следовательно, транспозиция вряд ли затрагивает случайные сайты. В соответствии с этим нет существенного полиморфизма по локализации этого элемента у всех проанализированных на сегодня штаммов *M. paratuberculosis* (Блум, 2002).

Анализ последовательности к 3'-концу от IS900 выявил наличие промотора, управляющего экспрессией ещё одной ОРС – ОРС2, расположенной на цепи ДНК, комплементарной той, что кодирует транспозазу (Murray et al., 1992). Последовательности IS900 предшествует последовательность, совпадающая с консенсусной последовательностью Шайн-Дальгарно, AAGGAG. Эта последовательность гомологична последовательности, комплементарной для инсерционных сайтов IS900. Тем самым при встраивании IS900 в некоторые участки генома экспрессия ОРС2 может регулироваться внешним промотором; последовательность Шайн-Дальгарно, вероятно, ассоциированная и с этим промотором, принадлежит к инсерционному сайту IS900. Роль ОРС2 пока остаётся неизвестной.

Обнаруженная в *M. avium* инсерция IS901 (Kunze et

al., 1991) имеет сходную с IS900 последовательность. IS901 не была найдена в изолятах *M. avium* от больных СПИДом и в изолятах из окружающей среды, но была обнаружена в 48 из 55 штаммов, выделенных от инфицированных птиц. Z.M. Kunze et al. (1991) предполагают, что данная последовательность ассоциирована с вирулентным фенотипом штаммов *M. avium*.

Подобно IS900, инсерция IS901 имеет большую ОРС без инвертированных повторов на концах и без прямых повторов, фланкирующих центральный элемент. Общая последовательность инсерций IS901 близка инсерциям IS900: CATN₍₇₎*TTCCNTTC. Сходные с этими инсерциями последовательности и свойства имеют IS110, IS116 и IS117 из *Streptomyces* spp., IS1000 из *Thermus thermophilus* и IS492 из *Pseudomonas atlantica* (Bruton, Chater, 1987; Leskiw et al., 1990). Последовательность IS1141, выделенная из *M. intracellulare*, состоит из 1588 пар оснований и имеет инвертированные повторы из 23 пар оснований на концах (Via, Falkinham, 1993). Последовательность для транспозазы сходна с таковой у членов семейства IS3. С этой последовательностью связывают вариабельность колоний.

1.2.2. Инсерции *M. tuberculosis* complex: IS6110, IS1081 и новая IS-подобная последовательность

В настоящее время практически идентичные IS-элементы, IS6110 и IS986, обозначают одним символом IS6110. Эта последовательность обнаруживается в разном числе копий и в разных участках генома у подавляющего большинства штаммов *M. tuberculosis*. Большинство изученных на сегодня штаммов несут от 5 до 20 копий, хотя ряд штаммов, преимущественно азиатского происхождения, несёт только одну копию этого элемента (лишь в четырёх выделенных во Вьетнаме изолятах IS6110 не обнаружена) (Collins et al., 1993; Yuen et al., 1993). Распределение копий по геному не совпадает в эпидемиологически не связанных

изолятах, что делает эффективным типирование штаммов *M. tuberculosis* и изучение передачи туберкулёза. Голландский вакцинный штамм БЦЖ несёт одну копию данного элемента, названную IS987 (Hermans et al., 1991). В дополнение к повтору 3-й пары оснований, соответствующему акцепторному сайту, IS987 элемент окружён ещё 20 дополнительными прямыми повторами по 36 пар оснований каждый. IS6110 сходна с элементами семейства IS3, наиболее широко распространённой группы, к которой относится около 25% всех выделенных IS. Размер инсерции IS6110 составляет 1361 пара оснований. В её состав входят неточные концевые повторы по 28 пар оснований и прямые повторы по 3 пары оснований, образовавшиеся, по-видимому, в результате дубликации акцепторной последовательности при транспозиции. Все эти признаки типичны для элементов IS3. IS6110 содержит две ОРС. Более длинная близка к гену транспозаз семейства IS3. IS6110 и другие члены семейства IS3 обнаруживают признаки, общие с ретровирусами, в том числе гомологию аминокислотных последовательностей, и возможность сдвига рамки считывания на –1, что приводит к появлению имеющих тенденцию к слиянию белков (Fayet et al., 1990).

Анализ участков, окружающих все четыре последовательности IS6110 в одном из штаммов *M. tuberculosis*, показал, что они различаются по трём нуклеотидным повторам. Это указывает на случайный характер транспозиции копий IS6110. Инсерции из семейства IS3 обнаружены и в других микобактериях – *M. gordonae*, *M. smegmatis* и *M. intracellulerae*.

Ещё одна специфичная для комплекса *M. tuberculosis* инсерция, IS1081, выявляется во всех штаммах этих видов в количестве 5 – 6 копий. В отличие от IS6110, локализация этого элемента в геноме разных штаммов не обнаруживает большого полиморфизма. Размер IS1081 – 1324 пары оснований, он содержит большую ОРС и имеет инвертированные повторы по 15 пар оснований на концах (Collins, Stephens,

1991). Эта инсерция близка IS256, IS406, IST2, ISRm3 и IS6120. Последняя, IS6120, была выделена из *M. smegmatis* (Guilhot et al., 1992).

В одной из копий IS1081 секвенированы фланкирующие последовательности, которые оказались близки акцепторным последовательностям для IS900 и IS116. Это даёт основание предположить, что, подобно двум названным элементам, для IS1081 характерно сайтспецифическое встраивание, чему соответствует и отсутствие полиморфизма в локализации данной последовательности.

Из *M. tuberculosis* была выделена ещё одна IS-подобная последовательность. Её размер 968 пар оснований, и на её концах находятся инвертированные повторы (с одной заменой) размером по 17 пар оснований. Во всех штаммах *M. tuberculosis* была выявлена лишь одна копия (Mariani et al., 2000). Хотя данные о транспозиции этого элемента пока не получены, очевидно его сходство с другими IS. Вместе с IS427 и IS869 из *Agrobacterium tumefaciens*, IS 402 из *Pseudomonas cepacia*, Tn 4811 из *Streptomyces lividans* и ISRm4 из *Rhizobium meliloti* эта последовательность входит в состав ранее неизвестного семейства мобильных элементов (Mariani et al., 2000).

1.2.3. Инсерции *M. smegmatis*: IS6120, IS1096 и IS1137

IS6120 удалось выделить из *M. smegmatis* при помощи транспозонной ловушки. Она состоит из 1486 пар оснований и несёт на концах неточные повторы по 24 пары оснований. Основной элемент фланкируют дубликации по 9 пар оснований. Сходство последовательностей ДНК позволяет объединить IS6120 с IS1081, IS256, IS406, IST2 и ISRm3 в новое семейство. Последовательность IS6120 содержит три ОРС, наибольшая из которых имеет сходство с длинной ОРС других членов семейства (Guilhot et al., 1992).

Встраивание мобильного элемента IS1096 размером 2260 пар оснований в различные участки гена *lacZ* приводит-

ло к появлению редких белых колоний (Cirillo et al., 1991). На концах этого элемента расположены неточные повторы по 26 пар оснований, а основной элемент фланкируют прямые повторы по 8 пар оснований, вероятно, соответствующие акцепторной последовательности. Данный мобильный элемент встречается только в *M. smegmatis*, присутствуя в количестве 8-16 копий, локализующихся крайне полиморфно.

Обнаружены две основные ОРС, большая часть из которых имеет некоторое сходство с ОРС транспозона Tn3962 и инсерции IS1001 (Cirillo et al., 1991; Van der Zee et al., 1993).

Третья выделенная из *M. smegmatis* инсерция – это IS1137, имеющая гомологию с элементами семейства IS3. Её размер – 1364 пары оснований, а строение типично для семейства IS3 – неточные инвертированные повторы по 28 пар оснований на концах, фланкирующих прямые повторы по 3 пары оснований и две ОРС, детерминирующие транспозазу после сдвига рамки считывания. IS1137 выявляется только в некоторых штаммах *M. smegmatis* и *M. chitae*.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение суммарной ДНК микобактерий из клинических образцов осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции с предварительной обработкой проб лизирующим раствором (Мазин и др., 1990). ДНК из чистых культур выделяют с применением сорбции на силикагеле с использованием набора ДНК-сорб (ЦНИИЭ). В работе использованы последовательности праймеров (табл. 32), заимствованные из источников литературы (Beggs et al, 2000; Adekambi et al., 2006; Allix et al., 2006; Xiong et al., 2006). В качестве маркеров выбраны: *mig*-ген, отвечающий за вирулентность *M. avium*, область *senX3* – *regX3*, характерная для *M. tuberculosis complex*; *mgtC*, отвечающий за вирулентность *M. tuberculosis*, 16S-23S rRNA – спейсерная последователь-

ность для индикации многих видов типичных и атипичных микобактерий; *groB*-ген для идентификации *M. fortuitum*.

Таблица 32

Последовательности праймеров для амплификации фрагментов генома микобактерий

| На- зва- ние | Вид микобак- терий | Ген- мишень | Последовательность |
|--------------------|--|----------------------|---|
| 3575 3576 | <i>M. tuber- culosis</i> | <i>mgtC</i> | 5'-CGCCTAGGCTCAAACCTGCTG-3' 5'-CAATACCCGGCGGATCTACC-3' |
| 3573 3574 | <i>M. fortui- tum</i> | <i>groB</i> | 5'-GGCAAGGTCACCCCGAAGGG-3' 5'-AGCGGCTGCTGGGTGATCATC-3' |
| 2727 2728 | <i>M. avium complex</i> | <i>mig- gene</i> | 5'-CCCGTTCAACGTCAACTTCC-3' 5'-GGGCTCGCCGGTCATCAGGT-3' |
| 3607 3608 | <i>M. tuber- culosis complex</i> | 16S rRNA | 5'-ACGGTGGGTATAGGTGTGGGTTC-3' 5'-TCTGCGATTATACGACTCCGACTTCA-3' |
| 3571 3572 | <i>Mycobac- terium spp.</i> | 16S-23S rRNA | 5'-ACCTCCTTTCTAAGGGCACC-3' 5'-GATGCTCGCAACCACTATTCA-3' |

ПЦР проводят в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5 мкл буфера для Tag-ДНК-полимеразы, 2,5 мкл mM dNTP mix, по 2,5 мкл каждого праймера с концентрацией 2 mM, 2,5 ед. активности Tag-ДНК-полимеразы, 5 мкл ДНК. Поверх реакционной смеси наслаивали 20 мкл минерального масла. Также используют готовый набор для амплификации GenPack PCR Universal. Постановку ПЦР осуществляют по общепринятым методикам на амплификаторе «Терцик» (Вартапетян, 1991; Глик, Пастернак, 2002). Параметры ПЦР отработаны при варьировании температуры отжига и количества циклов реакции:

– для выявления *M. tuberculosis* – 95°C×5 мин (1 цикл), 95°C×30 с, 50°C×30 с, 72°C×1 мин (40 циклов), 72°C×5 мин. При использовании такого режима амплификации получают искомый фрагмент в 80 п.н.;

– для выявления *M. tuberculosis complex* – 94°C×5 мин (1 цикл), 94°C×1 мин, 60°C×1 мин, 72°C×1 мин (25 циклов), 72°C×10 мин. При использовании такого режима амплификации получают искомый фрагмент в 543 п.н.;

– для выявления *M. avium complex* – 95°C×5 мин (1 цикл), 95°C×30 с, 68°C×2 мин, 72°C×5 мин (30 циклов), 72°C×4 мин. При использовании такого режима амплификации получают искомый фрагмент в 373 п.н.;

– для выявления *M. fortuitum* – 94°C×5 мин (1 цикл), 94°C×1 мин, 60°C×1 мин, 72°C×1 мин (25 циклов), 72°C×10 мин. При использовании такого режима амплификации получают искомый фрагмент в 700 п.н.;

– для выявления *Mycobacterium spp.* – 96°C×5 мин (1 цикл), 94°C×30 с, 60°C×30 с, 72°C×1 мин (35 циклов), 72°C×10 мин. Размеры ампликонов варьируют от 200 до 320 п.н.

Для определения концентрации ДНК и оценки на примесь белка делают два замера плотности раствора ДНК на спектрофотометре марки СФ-26 при длине волн 260 и 280 нм в кювете на 300 мкл, предварительно проведя измерения стерильной бидистиллированной воды. Если соотношение величин плотности D260 нм и D280 нм равно 1,75 и выше, то это показатель свободной от белков выделенной ДНК. Такую ДНК используют при определении чувствительности ПЦР.

Для измерения концентрации ДНК на спектрофотометре из 350 мкл ДНК берут 80 мкл и разводят до 400 мкл стерильной дистиллированной водой. Замеряют плотность при D260 нм, которая составляет 0,49 о.е./мл. Так как разводят в 5 раз, то умножают 0,49 о.е./мл \times 5 = 2,45 о.е./мл. Оптическая плотность D = 1 о.е. составляет 50 мкг/мл, т. е. имеется 2,45 \times 50 = 122,5 мкг/мл, или в одном 1 мкл содержится 0,12225 мкг. 1 пг = 1 \times 10⁻⁶ мкг, а 10 пг = 1 \times 10⁻⁵ мкг, следовательно, чтобы получить концентрацию 10 пг/мкл, разбавляют исходную концентрацию в 0,12225 мкг/мл выделенной ДНК в 100 раз. Делают 5 разведений, кратных 10, в объеме 10 мкл. Четвёртое разведение соответствует 10 пг,

а пятое – 1 пг. После приготовления разведений ДНК проводят ПЦР. Чувствительность составляет не менее 12 пг ДНК в 1 мкл.

Анализ полученных в ПЦР данных проводят методом электрофореза в агарозном и полиакриламидном геле. В качестве маркера используют pUC19/Kzo9 I и pBluescript/Msp. Результаты электрофореза учитывают в УФ-свете на трансиллюминаторе с длиной волны 254 нм.

Для последующего определения нуклеотидной последовательности ДНК фрагменты очищают при помощи наборов S.N.A.P.TM Gel Purification Kit для агарозных гелей («Invitrogen life Technologies»). Определение первичной нуклеотидной последовательности проводят на автоматическом секвенаторе «Beckman CEQ2000XL» («Beckman Coulter», США) согласно инструкции производителя. Филогенетический и популяционный анализ осуществляют с использованием программ MEGA 3.1. (PSU, США) и GeneDoc 2.6. методом «ближайших соседей». Для построения дендрограмм используют фрагменты нуклеотидных последовательностей микобактерий, депонированных в международной базе данных GenBank. Обработку последовательностей проводят с использованием специализированных программных пакетов MEGA (PSU, США) и DNASTAR (DNAStar Inc., США). Дендрограммы строят на MegAlign 4.04. из пакета программ DNASTAR, Inc., Madison, USA. Для статистической обработки данных при оценке достоверности группирования применяют бутстреп-тест (Felseinstein, 1985).

2.1. Определение нуклеотидной последовательности

Выделение продукта амплификации из ПААГ после проведения электрофореза осуществляют методом пассивной элюции с последующей очисткой от компонентов элюирующего буфера и осаждением. Вырезанные полоски ПААГ, содержащие продукт амплификации нужной длины, помещают в пробирки на 1,5 мл, добавляя 400 мкл элюиру-

ющего буфера (0,5 М NaOAc, 10 mM MgOAc, 1mM ЭДТА, 0,1% SDS) и инкубируют при 37°C в течение 14-18 ч. В пробирки добавляют 400 мкл фенола, насыщенного водой (pH 8,0), перемешивают встряхиванием и центрифугируют при 18000 g в течение 10 мин. Водную фазу отбирают в чистые пробирки на 1,5 мл, добавляют 400 мкл хлороформа, перемешивают встряхиванием и центрифугируют при 18000 g в течение 10 мин. Водную фазу отбирают в чистые пробирки на 1,5 мл с 2 мкл 20 мг/мл декстрана, добавляют 400 мкл (равный объём) изопропанола, перемешивают встряхиванием и центрифугируют при 18000 g в течение 15 мин. Изопропанол отбирают из пробирок при помощи водоструйного насоса, осадок двукратно промывают 200 мкл 70%-го раствором этанола. Этанол отбирают, осадок подсушивают на воздухе при комнатной температуре в течение 10 мин. Осадок растворяют в 10 мкл деионизованной воды. После проведения данных процедур для проверки качества выделения амплификата проводят аналитический электрофорез, нанося 1 мкл раствора очищенного амплификата.

Определение нуклеотидной последовательности выделенного ПЦР фрагмента проводят на «Beckman CEQ2000XL DNA Analysis System» («Beckman Coulter, Inc.») по методу Sanger et al., согласно инструкции к «Beckman sequencing Kit». Пример определения нуклеотидной последовательности представлен на рис. 1.

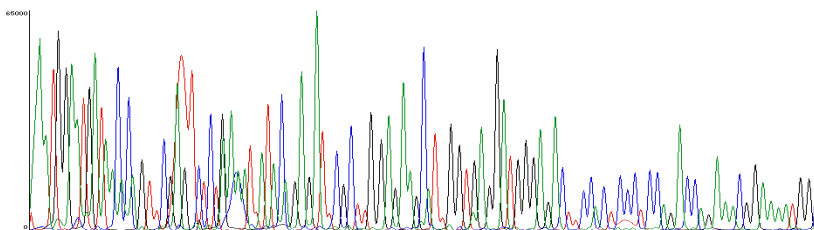


Рис. 1. Образец нуклеотидной последовательности, полученный на «Beckman CEQ2000XL»

Для проведения реакции в пробирках на 0,5 мл смешивают по 1 мкл раствора праймера с концентрацией 3 о.е./мл, 3 мкл раствора исследуемой ДНК и 6 мкл DTCS (содержит компоненты реакционного буфера, дезоксинуклеозидтрифосфаты, меченные флуоресцентными красителями дидезоксинуклеозидтрифосфаты, термофильную полимеразу). Суммарный объем реакционной смеси составляет 10 мкл. Реакцию проводят в следующем режиме: T=95°C, 20 с; T=50°C, 20 с; T=72°C, 1 мин; 40 циклов. После завершения последнего цикла в пробирки добавляют по 2 мкл стоп-реагента (100 мМ EDTA, 3 М NaOAc 1:1) для остановки реакции. Осаждение продуктов реакции из полученной смеси проводят, добавляя по 30 мкл охлажденного 96%-го этанола, в присутствии соосадителя (гликоген, входящий в состав набора). Смесь перемешивают встряхиванием и центрифугируют 15 мин при 14000 g, супернатант отбирают, осадок промывают 100 мкл охлажденного 70%-го этанола. Осадок подсушивают в открытых пробирках при комнатной температуре в течение 10 мин, растворяя в 20 мкл раствора для нанесения образцов из набора для секвенирования, после чего осуществляют разделение образцов. Обработку результатов секвенирования проводят при помощи пакетов программ SEQ 2000, Vector NTI и GENEDOC. Для каждого образца последовательность определяют двукратно, используя праймеры с различно направленной ориентацией.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Девять (9,5 %) изолятов, типированных как II группа по Раньону, принадлежали к виду *M. phlei* и были получены от крупного рогатого скота; 6 (6,3 %) изолятов показали положительный результат с праймерами, фланкирующими участок groV-гена, используемыми для идентификации *M. fortuitum*; 5 изолятов *M. fortuitum* были получены от крупного рогатого скота и 1 – от свиней.

При постановке ПЦР с клиническими изолятами фраг-

мент *mig*-гена, характерный для *M. avium*, был обнаружен в 60 (63,2%) образцах, первоначально охарактеризованных как III-IV группа по Раньону и неидентифицированные атипичные микобактерии. На рис. 2 приведена картина электрофореза продуктов амплификации (фрагмент *mig*-гена, равный 373 п.н.), свидетельствующая о наличии ДНК *M. avium*.

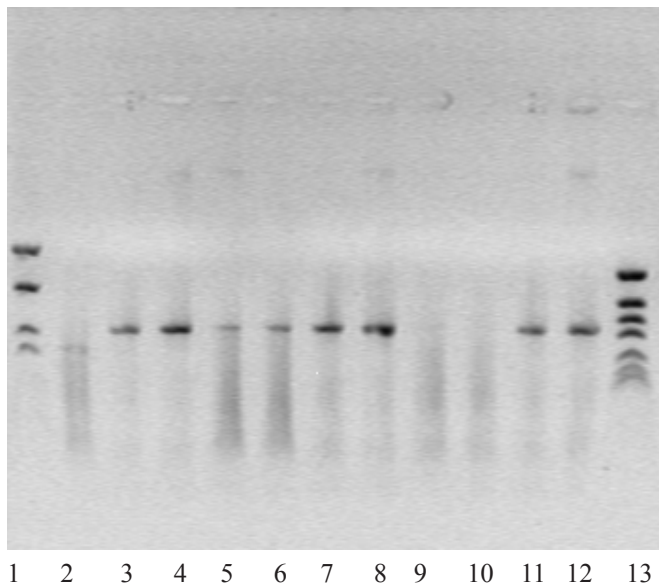


Рис. 2. Электрофореграмма фрагмента *mig*-гена *M. avium*

1 – маркер молекулярной массы (MspI, гидролизат плазмиды pUC19);
 2 – *M. smegmatis*; 3 – 10-06; 4 – 48-01; 5 – 26-06; 6 – 14-05; 7 – 30-04;
 8 – 18-06; 9 – *M. fortuitum*; 10 – *M. tuberculosis*; 11 – 8-03; 12 – 31-03;
 13 – маркер молекулярной массы

От крупного рогатого скота были получены 27 (45%) изолятов, 30 (50%) – от свиней и 3 (5%) – от птиц. При этом первоначально 5 изолятов *M. avium* были охарактеризованы как типичные возбудители туберкулёза, вызывая характерную клиническую и патолого-анатомическую картину. При

культивировании на плотной питательной среде фенотипически они также проявляли свойства типичных микобактерий и росли в виде суховатых колоний цвета слоновой кости.

Остальные 18 (18,9%) изолятов были идентифицированы до рода *Mycobacterium* spp.

3.1. Генотипирование изолятов *M. arupense* и *M. terrae*

При анализе изолята, выделенного в 2003 г. от свиньи на территории Ордынского района Новосибирской области, получены фрагменты ДНК в количестве, достаточном для прямого определения нуклеотидной последовательности фрагмента 16S-23S рРНК, идентифицированные при секвенировании как *M. arupense*. На вскрытии в лимфоузлах у исследованных животных были обнаружены очаги с кашеобразным содержимым, размером с просыаное зерно, наблюдались кровоизлияния и стёртость между слоями органа. J.L. Cloud et al. (2006) классифицируют этот потенциально новый вид микобактерий как элемент *Mycobacterium terrae complex*, включающий *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. hiberniae* и *M. triviale*. Сибирский вариант генетически близок изолятам *M. terrae* и *M. arupense*, выделенным в 2005 г. в Индии и в июне 2006 г. на территории Италии и США (Cloud et al., 2006). В это же время в Японии впервые были зафиксированы случаи выделения *M. arupense* от человека (Masaki, Ohkusus, Hata et al., 2006). В Африке *M. arupense* был изолирован от грызунов и насекомых видов *C. gambianus*, *Mastomys natalensis* и *C. hirta* (Durnez et al., 2007). Эти факты подтверждают высокую тропность *M. arupense* к человеку, домашним животным, грызунам и насекомым, а также их роль в распространении этого вида микобактерий в природных очагах.

Выровненные последовательности изолята *M. arupense*, выделенного в Новосибирской области, демонстрируют нуклеотидные замены, отличающие его от прото-

типных штаммов (№ 48 на рис. 3). При построении филогенетического дерева *M. arupense* образовал 3 кластера с прототипными штаммами, зарегистрированными ранее в GenBank, которые, в свою очередь, объединяют несколько мелких ветвей. Наибольшую гомологию этот вариант имеет со штаммом *M. arupense*, изолированным и описанным на территории Италии в 2003 г. авторами Тортолли и Мариоттини. При тестировании процедурой бутстрепа *M. arupense* образовывал один клад с прототипом, имея индекс поддержки 95% (рис. 4). Однако для сибирского варианта *M. arupense* характерны аминокислотные замены в следующих паттернах: NCQ→NRQ, GLF→GQL, PLC→PLV (рис. 5).

Среди изучаемой выборки был обнаружен изолят *M. terrae*, как правило, выделяемый из почвы и считающийся непатогенным. При этом известны случаи выделения *M. terrae* из синовиальной ткани запястья у людей с хроническим воспалением синовиальных бурс (Hoffman et al., 1981). Сибирский изолят выделен из почвы выгульной площадки в 2004 г. и генетически близок штамму, полученному в 2001 г. в Китае (№ 51 на рис. 3). При этом прототипные штаммы являются более древними в сравнении с сибирским изолятом. Несмотря на то, что изолят относительно новый, он претерпел некоторые изменения. При построении ML-дерева изолят *M. terrae* образовал один кластер с изолятами *M. terrae* Восточно-Азиатской части материка, имея при этом индивидуальную ветвь (рис. 6).

В сравнении с прототипным штаммом сибирский вариант *M. terrae* имеет оригинальные нуклеотидные последовательности, приводящие к аминокислотным заменам в следующих паттернах: VLQ→NLR, TTT→TAT, SLI→ALI, INC→TNR (рис. 7). Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности фрагмента 16S-23S рРНК *M. terrae* показан на рис. 8.

51 -----TGGTTGGGATACATTTTCGCC
dq133999 CCAATTTTTTCCCCGCGCCTCACATGGGT-

GAGGGTTCTCG.....GC.G
dq1686~1 ACCATTTTCCCCCGTCCCCGCAAAGAGTGCGG-
GATCGTGA.....TT.....
dq523527 ACCATTTTCCCCCGTCCCCGCAAAGAGTGCGG-
GATCGTGA.....TT.....
48 -----TGGTTGGGATACATTTCCGCC
aj314868 ACCACTTTTTTCCCCCGTGCCTCACATGGGTGAGGGTTTT
TGC.G.T..GACAG.G.TTG.
dq168663 ACCATTTTCCCCCGTCCCCGCAAAGAGTGCGG-
GATCGTGA.....TT.....
dq523527 ACCATTTTCCCCCGTCCCCGCAAAGAGTGCGG-
GATCGTGA.....TT.....

51 GGCTGCCTGTAGTGGGTGTTTCGGTGGTGCAGAGTAATT-
TACGAACAGCAACAGCTTTGAT
dq133999 ..CG-C.TGTAGTG..T..C.....-.....AGCGC...
dq1686~1 ..G.....K.GT...SA...A...GT.....
dq523527 ..G.....GT...A...A...GT.....
48 GGGTGCCTGTAGTGGGTGTCCGGTGGTGCAGAGTGTTT-
TACAAACAACAACGTCTTTGAT
aj314868 C.....G.....GAA..ACG..CA.CA.CAAG...GCGA
dq168663T.....K.....S.....
dq523527T.....

51 CACCAACCGGCATGACCTCTTTGGAGGTGGTGTCCGCCG-
GCCCTTTG--GGTTGGGCACA
dq133999C.GG..G.--G..ATC.T.TC..GT.....-....TG.....
dq1686~1 ..T...T.C..G..G.--....TGCT.-C..GT.....--.....
dq523527 ..T...T.C..G..G.--....TGCT.-C..GT.....--.....
48 CATCAACCGCCAGGAGTTTTGTGCTTCTGGTGGCCGGC-
CGCGTGGGTGTTGGGCACACTGTT
aj314868 G...T.AA.TGCC..GAG.CCTTGGGG.T.TCTG.TGGC..
GCTT...T..TGGGCACA
dq168663T.....C.....CTT.....
dq523527T.....C.....CTT.....

51 CTGTTGGGTCTGAGGCAACAGGCCTGTTTTCGCCCT-
GTGTGGGGTGGGTGTGTTGTGCG
dq133999G.T....C-----
dq1686~1

dq523527
 48 GGGTCCTGAGGCAACAGGCCAGTTGTGCCCCCT-
 GTGGGGGGTGGGTGTGTTGTCGCTCCA
 aj314868 CT..TGG.TCCTG.GGCAA...GCCCGTTTGTGCCCCC.....G...
 GGTGTTG.TGT
 dq168663T..T.....T.....
 dq523527T..T.....T.....

 51 CTCCATCTTGGTGGTGGGGTGTGGTGTGTTTGTGTTTGT-
 GAATAGTGTT-----
 dq133999 -----
 dq1686~1GCGAGCATCTAAC
 dq523527GCGAGCATCTAAC
 48 TCTTGGTGGTGGGGTGTGGTGTGTTTGTGTTTGTGAATAGTG-
 GTT-----
 aj314868 CGCCTCACACTT...GT.G.G.GTGG.GT.TGT.TTGT.GA-
 TAGTGGTTGCGAGCATCT
 dq168663GCGAGCATCTAACAAGCA
 dq523527GCGAGCATCTAACAAGCG

Рис. 3. Нуклеотидная последовательность изолята *M. arupense* 2003 г. (№ 48) и изолята *M. terrae* (№ 51). Сравнение проводилось с последовательностями прототипных штаммов. Идентичные основания показаны точками, отсутствующие основания – дефисами



Рис. 4. Консенсусное ML-дерево последовательностей 16S-23S рРНК *M. arupense* (цифра 48 на рисунке)

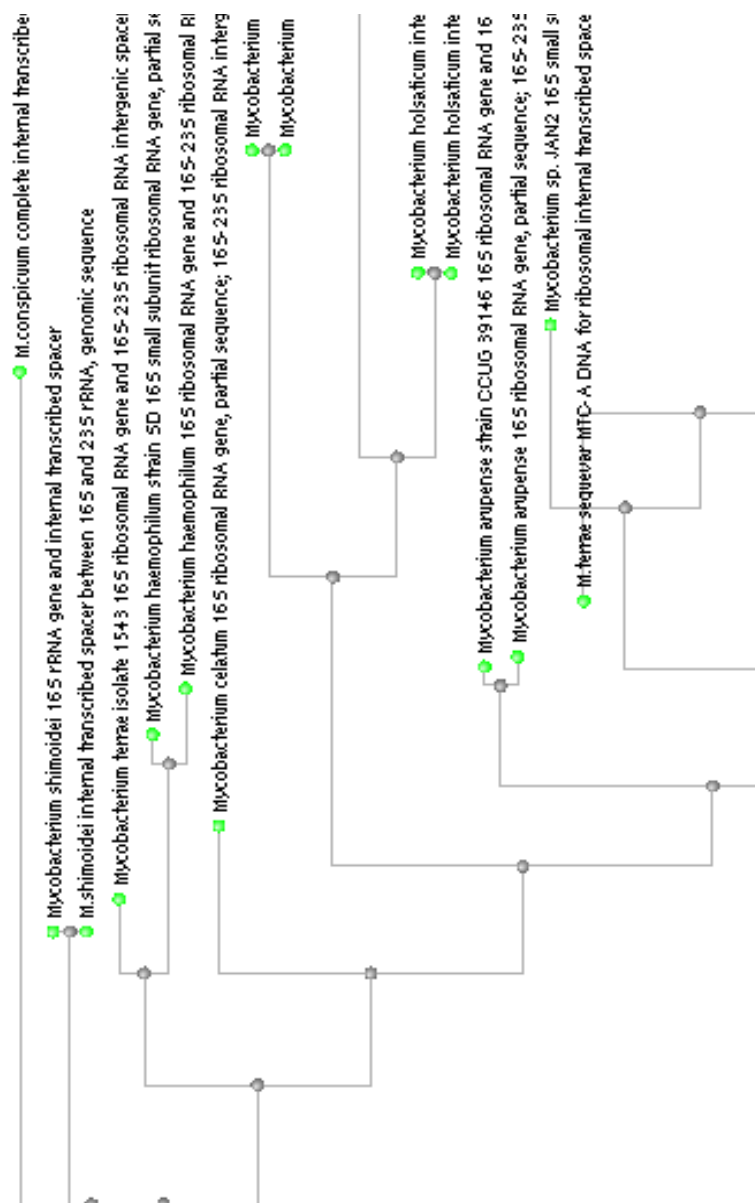


Рис. 8. Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности фрагмента 16S-23S рРНК *M. terrae*

3.2. Генотипическое разнообразие *Mycobacterium avium*

Среди изолятов *M. avium*, идентифицированных нами, удалось выделить достаточное количество фрагментов ДНК для следующих проб: 48-01, 35-02, 61-02, 16-03, 19-03, 20-03, 21-03, 24-03, 28-03, 29-03, 31-03, 49-04, 2-05, 3-05, 12-05, 14-05, 10-06, 18-06, 26-06. Из них в пробах 24-03, 29-03 и 21-03 определена последовательность спейсера 16S-23S рРНК. Для оставшихся проб секвенирован фрагмент последовательности *mig*-гена, отвечающего за вирулентность *M. avium*.

Наибольшая гомология наблюдалась с прототипным штаммом *M. avium* str. 104. Выровненные последовательности представлены на рис. 9.

Представленные данные показывают, что фрагмент нуклеотидной последовательности *mig*-гена (118 – 165 п.н.) изолята 31-03 содержит уникальную нуклеотидную замену, которая находится в положении 142 (CAT→CCT).

```

Tub31-03 1      TTCAACGTCAACTTCCGCTACGT-
CAAAAGCGAACTGCACTACCTGGTCGCGGACTACGAG 60
Tub10-06 1      ..... 60
Tub48-01 1      .....C.....C.... 60
Tub26-06 1      .....C..... 60
CP000479 1562672 .....C.....C....
1562613
CP000479 625932 .....A.....G.GG...G...G.....T...
ACA...C...C 625990
U43598 790      .....C.....C.... 849
AE016958 2674569 .....C.....C....
2674628
AE016958 575375 .....A.....G.GG...G...G.....T...
ACA...C...C 575433
CP000480 2325378 .....A.....G.A.....C.GA.C...
GC..G. 2325319
CP000480 5975149 .....T.....G.GG.G..G..CA.G....
CT...A.A...C...C 5975091
CP000511 2149558 .....A.....G.....C.G..C..T.CG.
GC 2149499

```

CP000511 5585687G..G.T.G..A.G....T..A.A..
 CG..C 5585629
CP000656 4607755A.....G....G....G.....C.G.....GCG.
 GT 4607814
CP000656 1611061T..G.GG.T.G...A.G....
 1611103
CP000580 1868037A.....ACGCGA..G...G.....C..AC..
 AG..G. 1867978
CP000580 5249531G.GG.G..GT..
 GG.....T...A.A...C...C 5249473
CP000325 4325609G....G..G.A..G.C..G....TC.G.....-
 .G..G. 4325667
CP000325 4545482G.GG.G..G...A.G.....T..
 ACA...C...C 4545424
CP000518 1947068A.....ACGCGA..GT..G...T.C..
 AC...AG..G. 1947009
CP000518 4940761G.GG.G..GT..
 GG.....T...A.A...C...C 4940703
CP000384 1928084A.....ACGCGA..GT..G...T.C..
 AC...AG..G. 1928025
CP000384 4901621G.GG.G..GT..
 GG.....T...A.A...C...C 4901563

**Tub31-03 61 -GCGACCGCGCTGATCTACCA-CGCGGC-
 GTTCGCGCCCCGGGTGGCCGAGATCCTGCCC 117**
 Tub10-06 61 -.....-.....-..... 117
 Tub48-01 61 -.....-.....A-..... 117
 Tub26-06 61 -.....-.....-..... 117
CP000479 1562612 -.....-.....-.....
 1562556
CP000479 625991 -AT.GTG.....G..C..G.--...C.A..A.T.CGA.....A
 .CG.G..... 626047
U43598 850 -.....-.....-..... 906
AE016958 2674629 -.....-.....-.....
 2674685
AE016958 575434 -AT.GTG.....G..C..G.--...C.A.CA.T.CGA.....
 A.CG.G..... 575490
CP000480 2325318 -.....A...G.G....-.....A-.....CA.C.....
 GCGA. 2325262
CP000480 5975090 -AT.GT.....
 5975079
CP000511 2149498 -..C.....C.....-...C.-.....C..G..AC.....
 AG.....G.. 2149442
CP000511 5585628 -AT.GT.....G.GC..G.G...C.--..A...

CGA.....A.CG.G..... 5585572
CP000511 77418TT.....CA.G.C.....G..
77455
CP000656 4607815CC.....T.A.....A.....C.....G...CG..
4607871
CP000580 1867977 ..C...A...C.....TG-C.....C.C.....G
.G..... 1867921
CP000580 5249472 -AT.GTG.....C.G.--T.A.A.AGC.....C.C...
A.CG..... 5249416
CP000325 4325668 C.C.....CA.....G.....C.....
AG.G..A... 4325725
CP000325 4545423 -AT.GTG...T.G.C.G.--T.A.A...
GA...A.C...A.CG.G.....G 4545367
CP000518 1947008 -.C...A...C.....ATG-C.....C.C.....G
.G..... 1946952
CP000518 4940702 -AT.GTG.....C.G.--T.A.A.AGC.....C.C...
A.CG..... 4940646
CP000384 1928024 -.C...A...C.....ATG-C.....C.C.....G
.G..... 1927968
CP000384 4901562 -AT.GTG.....C.G.--T.A.A.AGC.....C.C...
A.CG..... 4901506

**Tub31-03 118 GACCTGCCGGGGCTTCGGGTGCTCCTC-
CAGATCGCCGACAAGTCGGGC 165**

Tub10-06 118A..... 165
Tub48-01 118 .G.....C.....G..... 165
Tub26-06 118 .G.....C.....A..... 165
CP000479 1562555C.....A.....G..... 1562508
CP000479 626048 ... 626050
U43598 907 ..G.....C.....A.....G..... 954
AE016958 2674686 ..G.....C...A.....TA.....G..... 2674733
AE016958 575491 ... 575493
CP000480 2325261 ..G..T.CAC..G.....A.....GGT.....
2325214
CP000511 2149441CAAC..CAA...C.GA.....G.C.C...
2149394
CP000511 5585571 .. 5585570
CP000511 77456 77462
CP000656 4607872 ..T.C..TTC..CAA...C.GA.....G.C.C..
4607918
CP000580 1867920C...G..CACC..GA....G.....
1867882
CP000580 5249415 ...A.....C.. 5249402
CP000325 4325726 ..AT.A.CC...C.C.C..GA.T.A.....G.C.C..

| | | | | |
|---------|----------|---------|----------------------------------|---------|
| 4325772 | CP000325 | 4545366 | ... | 4545364 |
| | CP000518 | 1946951 |C....G..CACC..GA.....G..... | |
| 1946913 | CP000518 | 4940645 | ...A.....C.. | 4940632 |
| | CP000384 | 1927967 |C....G..CACC..GA.....G..... | |
| 1927929 | CP000384 | 4901505 | ...A.....C.. | 4901492 |

Рис. 9. Сравнение выровненных последовательностей изолятов *M. avium* с прототипными штаммами, зарегистрированными ранее в GenBank

Изоляты 31-03 и 10-06, выделенные в 2003 и 2006 гг. соответственно, имеют уникальные аминокислотные замены, находящиеся в одинаковых позициях: DSE→DYE, PRL→PGL, DES→DKS.

В сравнении с прототипным штаммом MAU43598 22 клинических изолята *M. avium* Сибирского региона имеют характерные нуклеотидные замены в положении 130 п.н. (AGC→ACC), 233 п.н. (GCA→GGA), 241 п.н. (CCA→CCG) и 343 п.н. (CAT→CGT).

Аминокислотные последовательности 3 изолятов *M. avium*, выделенных в Сибирском регионе, имеют значительную степень гомологии с аминокислотной последовательностью *M. avium* subsp. *paratuberculosis* шт. К10. При построении консенсусного ML-дерева они образовали общую кладу. Данный подвид микобактерий комплекса *M. avium* является этиологическим фактором болезни Крона крупного рогатого скота и имеет >3,000 генов, гомологичных возбудителю туберкулёза человеческого вида (Li et al., 2005).

3.3. Генетическая характеристика изолята *M. tuberculosis*

В 2000 г. в Тюменской области получен изолят *M. tuberculosis* от крупного рогатого скота. При построении консенсусного ML-дерева изолят образовал одну кладу с изолятом *M. tuberculosis* AM709731, выделенным на территории Кувейта в 2007 г., с индийским изолятом 2005 г. DQ133991 и с китайским изолятом AJ307713, выделенным в 2001 г. (рис. 10). 100 %-я гомология данного изолята с последовательно-

стями прототипных штаммов, выделенных на территории Европы и азиатских стран, указывает на то, что ген не претерпел изменений и достаточно консервативативен. Однако имеется уникальная аминокислотная замена в паттерне RTG→RTE (рис. 11). В то же время глицин, заменивший глутаминовую кислоту, имеет существенно меньший размер. Таким образом, эта замена является консервативной и, вероятно, не может повлиять на свойства белка в данном участке. Однако с точки зрения изучения лекарственной устойчивости необходимо учесть одно немаловажное обстоятельство: у *M. tuberculosis* в отличие от некоторых бактериальных патогенов (*S. typhimurium*, *S. aureus*) в геноме имеется только по одной копии генов 16S и 23S РНК. Следовательно, одна мутация в соответствующем кодоне может привести к доминированию резистентности или резистентного фенотипа: все рибосомы будут устойчивы к таким ингибиторам белкового синтеза, как, например, стрептомицин или кларимицин.

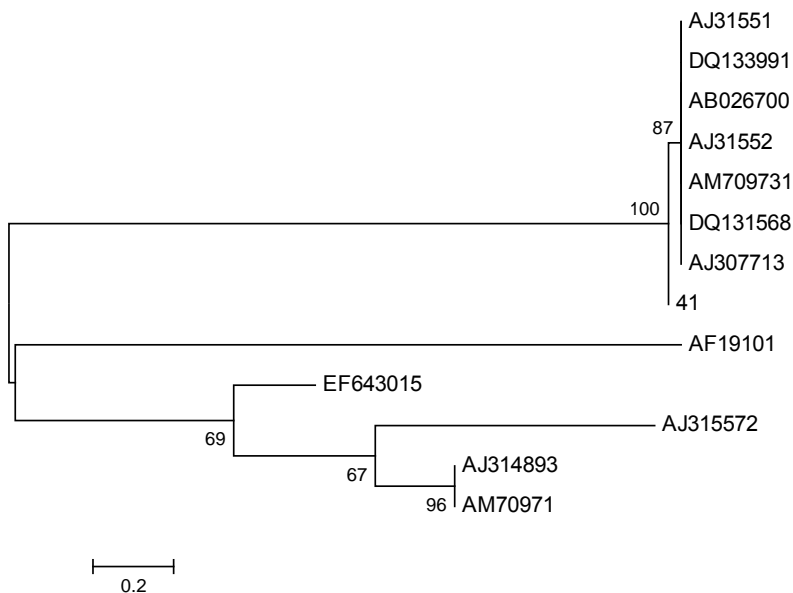


Рис. 10. Консенсусное ML-дерево изолята *M. tuberculosis* (№ 41)

шения между штаммами возбудителей туберкулёза, делать статистически обоснованные выводы и прогнозы о тенденциях распространения туберкулёза (Лазовская и др., 2004). В прикладном аспекте молекулярная эпизоотология включает новейшие методы индикации и идентификации возбудителей, основанные на особенностях первичной структуры генов. Сюда можно отнести различные модификации метода ПЦР, которые легли в основу создания разнообразных типов ДНК-маркеров, широко используемых в настоящее время в различных областях медицины и биологии, а также метод секвенирования нуклеотидных последовательностей для более детального изучения структуры генов. Успехи в развитии генетических исследований обусловлены наличием информативных генетических маркеров.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК к части 3

1. Аксёнов М.Ю. Диагностика инфекционных заболеваний с помощью метода полимеразной цепной реакции / М.Ю. Аксёнов, А.Л. Гинцбург // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1993. – №4. – С. 1-7.
2. Блум Б. Туберкулёз. Патогенез, защита, контроль / Б. Блум. – М.: Медицина, 2002. – 696 с.
3. Аляпкина Ю.С. Количественный ПЦР-анализ: разработка системы определения содержания амплифицированного фрагмента ДНК / Ю.С. Аляпкина, М.Ю. Аксёнов, Б.К. Чернов и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1994. – №5. – С. 22-26.
4. Борисова Т.А. ПЦР для индикации микобактерий с использованием различных тест-систем в животноводческих хозяйствах Республики Татарстан / Т.А. Борисова, Н.З. Хазипов, А.В. Иванов и др. // Генодинамика инфекционных болезней. – М., 2004. – С. 205-208.
5. Бравве Ю.И. Инфекционные болезни и предиктивная геномная медицина / А.Б. Масленников, С.А. Песков и др. // Генодиагностика инфекционных болезней: материалы рос. науч.-практ. конф. – Новосибирск, 2005. – С. 18 – 21.
6. Вартапетян А.Б. Полимеразная цепная реакция / А.Б. Вартапетян // Молекулярная биология. – 1991. – Т. 25, вып. 4. – С. 926 – 936.
7. Вишневский Б.И. Чувствительность и специфичность теста, основанного на полимеразной цепной реакции, при диагностике туберкулёза периферических лимфатических узлов / Б.И. Вишневский, Е.Д. Мирлина // Пробл. туберкулёза. – 1998. – № 4. – С. 25 – 28.
8. Владимирский М.А. Эффективность обнаружения микобактерий туберкулёза методом ПЦР / М.А. Владимирский, Л.К. Шипина, М.В. Левченко // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких. – 2003. – № 12. – С. 28 – 30.
9. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М., 2002. – С. 94.

10. *Гребенникова Т.В.* Молекулярные методы исследования в диагностике туберкулёза / Т.В. Гребенникова, С.Л. Кальнов, А.Д. Забережный и др. // Вет. патология. – 2004. – № 1. – С. 92-93.

11. *Гущин А.Е.* Разработка и апробация тест-системы для диагностики *Chlamydia trachomatis* на основе технологии Nucleic Acid Sequence Based Amplification в реальном времени (NASBA-REAL-TIME) / А.Е. Гущин, П.Г. Рыжих, Г.А. Шипулин и др. // Генодиагностика инфекционных болезней: материалы рос. науч.-практ. конф. – Новосибирск, 2005. – С. 257-264.

12. *Жуховицкий В.Г.* Принцип безусловной необходимости и разумной достаточности в планировании лабораторных помещений для постановки полимеразной цепной реакции / В.Г. Жуховицкий // Лаборатория. – 2000. – № 4. – С. 3-5.

13. *Иванова М.М.* Использование метода ПЦР для амплификации и последующей детекции генетического материала в животноводстве и ветеринарии / М.М. Иванова, В.Н. Лазарева // Современные методы биотехнологии в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: метод. рекомендации. – М.: МСХА, 1998. – С. 59-82.

14. *Ильина Е.Н.* Актуальные аспекты типирования микробов и вирусов / Е.Н. Ильина // Генодиагностика инфекционных болезней: сб. тр. 5-й Всерос. науч.-практ. конф. – М., 2004. – Т. II. – С. 34-35.

15. *Калмыкова М.С.* Диагностическая ценность ПЦР-тест-систем при туберкулёзе животных: автореф. дис. ... канд. вет. наук / М.С. Калмыкова. – М., 2007. – 27 С.

16. *Корнева И.Н.* Конструирование ПЦР-тест-систем для обнаружения и идентификации микобактерий туберкулёза у животных / И.Н. Корнева, В.В. Дёмкин // Вет. патология. – 2004. – № 1. – С. 95-96.

17. *Ладыгина В.А.* Диагностика инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции / В.А. Ладыгина, О.А. Карпова, Е.Т. Староверова // Современные технологии в лабораторной диагностике. – 2001. – № 3. – С. 59-60.

18. Лазовская А.Л. Генетическое типирование штаммов *M. bovis*/ А.Л. Лазовская, З.Г. Воробьёва, К.Н. Силина // Ветеринария. – 2004. – № 7. – С. 26-28.

19. Мазин А.В. Методы молекулярной генетики и генетической инженерии / А.В. Мазин, К.Д. Кузнецов, А.С. Краев и др. – Новосибирск: Наука, 1990. – 248 с.

20. Майорова А.А. Исследование коллекции микобактерий нетуберкулёзного комплекса рестрикционным анализом амплифицированного фрагмента спейсерной последовательности 16S-23S рибосомной ДНК/ А.А. Майорова, В.Н. Степаншина, И.Г. Шемякин и др.// Проблемы туберкулёза и болезней лёгких. – 2004. – № 11. – С. 34-36.

21. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э.Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 112 с.

22. Маянский А.Н. Микобактерии: туберкулёз и микобактериозы. – Н. Новгород: Изд-во Нижегород. гос. мед. акад., – 2000. – 74 с.

23. Момыналиев К.Т. Перспективы применения методов ДНК-диагностики в лабораторной службе / К.Т. Момыналиев, В.М. Говорун // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 4. – С. 25-32.

24. Панин А.А. Полимеразная цепная реакция – необходимый инструмент для идентификации и типирования возбудителей инфекционных болезней животных / А.А. Панин, И.Л. Обухов, К.Н. Груздёв // Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России. – М., 1999. – Т.1. – С. 313-315.

25. Розанцев К.Э. Полимеразная цепная реакция *in vitro* – новый подход в диагностике // Бюл. ВИЭВ. – 1991. – Вып. 75-76. С. 47-50.

26. Сурикова О.В. Дифференциация микобактерий туберкулеза семейства W-Beijing, распространенных на территории Российской Федерации, на основе VNTR-типирования / О.В. Сурикова, Д.В. Войтих, Г.А. Кузьмичева и др.// Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2005. – № 3.

27. *Хазипов Н.З.* Молекулярная генодиагностика в ветеринарии / Н.З. Хазипов, А.Н. Аскарова. – Казань, 2002. – С. 44.

28. *Чередник Ю.А.* Молекулярно-генетическое типирование клинических изолятов *M. tuberculosis* в Украине / Ю.А. Чередник, О.В. Аноприенко, Ю.И. Фещенко // Украин. пульмонолог. жур. – 2005. – № 4. – С. 66-68.

29. *Черноусова Л.Н.* Роль ПЦР-анализа в комплексных бактериологических анализах во фтизиатрии / Л.Н. Черноусова, Е.Е. Ларионова, Э.В. Севастьянова и др. // Пробл. туберкулёза. – 2001. – № 3. – С. 58-60.

30. *Шаров А.Н.* Тест-системы при туберкулёзе / А.Н. Шаров, В.А. Седов // Ветеринария. – 1998. – № 3. – С. 20-22.

31. *Шаров А.Н.* Эффективность методов прижизненной диагностики туберкулёза/ А.Н. Шаров, Л.А. Ерошенко, И.П. Суханов и др.// Ветеринария. – 2000. – №2. – С. 16-18.

32. *Шемякин И.Г.* Характеристика клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* с использованием молекулярно-биологических методов / И.Г. Шемякин, В.Н. Степаншина, И.Ю. Иванов и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2003. – №1. – С. 32-40.

33. *Шибата Д.* Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов // Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – С. 395-398.

34. *Ablordey A.* PCR Amplification with Primers Based on IS2404 and GC-Rich Repeated Sequence Reveals Polymorphism in *Mycobacterium ulcerans* // A. Ablordey, R. Kotlowski, J. Swings et al. // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 448-451.

35. *Adekambi T.* Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. Nov., a *Mycobacterium fortuitum* Group Organism Isolated from a Posttraumatic Osteitis Inflammation / T. Adekambi, A. Stein, J. Carvajal et al. // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 1268-1273.

36. *Agerton T.B.* Spread of strain W, a hingly drug-resistant

strain of *Mycobacterium tuberculosis*, across the United States / T.B. Agerton, S.E. Valway, R.J. Blinkhorn et al. // *Clin. Infect. Dis.* – 1999. – Vol. 29. – P. 85-92.

37. *Allix C.* Evaluation of the Epidemiological Relevance of Variable-Number Tandem-Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis* and Comparison of the Method with IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Spoligotyping / C. Allix, K. Walravens, C. Saegerman et al // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – P. 1951 – 1962.

38. *Altamirano M.* Characterization of a DNA probes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by polymerase chain reaction / M. Altamirano, M.T. Kelly, A. Wong et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 1992. – Vol. 30. – P. 2173-21.

39. *Banu S.* Genotypic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Bangladesh and Prevalence of the Beijing Strain / S. Banu, S.V. Gordon, S. Palmer et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42. – P. 674-682.

40. *Beggs M.* Specific Identification of *Mycobacterium avium* Complex Isolates by a Variety of Molecular Techniques / M. Beggs, R. Stevanova, K.D. Eisenach // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 38, № 2. – P. 508-512.

41. *Bifoni P.J.* Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains / P.J. Bifoni, B. Mothemo, B.N. Kreiswirth // *Trends Microbiol.* – 2002. – Vol. 10, № 1. – P. 45-52.

42. *Bifoni P.J.* Origin and interstate spread of a New York City multi drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family / P.J. Bifani, B.B. Plikaytis, V. Kapur et al. // *JAMA.* – 1996. – Vol. 275. – P. 452-457.

43. *Blackwood K.S.* Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to Manitoba tuberculosis cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten / K.S. Blackwood, J.N. Wolfe, A.M. Kabani // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42, № 11. – P.5001-5006.

44. *Bruton C.J.* Nucleotide sequence of IS110, an insertion sequence of *Streptomyces coelicolor* A3(2) / C.J. Bruton,

K.F. Chater // Nucleic Acids Res. – 1987. – Vol. 15. – P. 7053-7056.

45. *Cirillo J.D.* A novel transposon trap for mycobacteria: isolation and characterization of IS1096 / J.D. Cirillo, R.G. Barletta, B.R. Bloom et al. // J. Bacteriol. – 1991. – Vol. 173. – P. 7772–7780.

46. *Cloud J.L.* Mycobacterium arupense sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens / J.L. Cloud, J.J. Meyer, J.I. Pounder et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – Vol. 56, – P. 1413-1418.

47. *Cole S.T.* Analysis of the genome of Mycobacterium tuberculosis H₃₇R_v / S.T. Cole, B.G. Barrell // Novartis Found Symp. – 1998. – Vol. 217. – P. 160-172.

48. *Collins D.M.* Identification of an insertion sequence, IS1081, in Mycobacterium bovis / D.M. Collins, D.M. Stephens // FEMS Microbiol. Lett. – 1991. – Vol. 83. – P. 11-16.

49. *Collins D.M.* DNA fingerprinting of Mycobacterium bovis strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110 / D.M. Collins, S.K. Erasmuson, P.M. Stephensen et al. // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31.– P. 1143-1147.

50. *Cousins D.* Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of Bovine Tuberculosis / D. Cousins, S. Williams, E. Liebana et al. // J. Clin. Microbiol. – 1998. – Vol. 36.– P. 8-88.

51. *Durnez L.* First findings of mycobacteria in African rodents and insectivores using stratified pool screening / L. Durnez, M. Eddyani, G.F. Mgode et al. // Appl Environ Microbiol. – 2007.

52. *Eisenach K.D.* Repetitive DNA sequences as probes for Mycobacterium tuberculosis / K.D. Eisenach, J.T. Crawford, J.H. Bates // J. Clin. Microbiol. – 1988. – Vol. 26. – P. 2240–2245.

53. *Gopaul C.C.* Progression Toward an Improved DNA Amplification-Based Typing Technique in the Mycobacterium tuberculosis Epidemiology / C.C. Gopaul, T.J. Brown,

A.L. Gibson et al. // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44 – P. 2492-2498.

54. *Green E.P.* Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis* / E.P. Green, M.L.V. Tizard, M.T. Moss et al. // Nucleic Acids Res. – 1989. – Vol. 17. – P. 9063-9073.

55. *Guilhot C.* Isolation and analysis of IS6120, a new insertion sequence from *Mycobacterium smegmatis* / C. Guilhot, B. Gicquel, J. Davies et al. // Mol. Microbiol. – 1992. – Vol. 6 – P. 107-113.

56. *Fayet O.* Functional similarities between retroviruses and the IS3 family of bacterial insertion sequences / O. Fayet, P. Ramond, P. Polard et al. // Mol. Microbiol. – 1990. – Vol. 4. – P. 1771-1777.

57. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // Evolution. – 1985. – Vol. 39. – P. 787-791.

58. *Fleischmann R.D.* Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains / R.D. Fleischmann, D. Alland, J. A. Eisen et al. // J. Bacteriol. – 2002. – Vol. 184. – P. 5479-5490.

59. *Frothingham R.* Molecular phylogeny of the *Mycobacterium avium* complex demonstrates clinically meaningful divisions / R. Frothingham, K.H. Wilson // J. Infect Dis. – 1994. – Vol. 169, №2. – P. 305-312.

60. *Hall L.* Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory / L. Hall, K.A. Doerr, S.L. Wohlfiel et al. // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 1447-1453.

61. *Hermans P.W.* Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains / P.W. Hermans, D. van Soolingen, E.M. Bik // Infect. Immun. – 1991. – Vol. 59 – P. 2695-2705.

62. *Hillis D.M.* An empirical test of bootstrapping as a

method for assessing confidence in phylogenetic analysis / D.M. Hillis, J.J. Bull // Systematic Biology. – 1993. – Vol. 42. – P. 182-192.

63. Hoffman, P.C. Two outbreaks of sternal wound infections due to organisms of the *Mycobacterium fortuitum* complex / P. C. Hoffman, D. W. Fraser, F. Robicsek et al. // J. Infect. Dis. – 1981. – Vol. 143. – P. 533-542.

64. <http://www.cbio.ru/>.

65. http://www.mirrabort.com/work/work_69223.html.

66. Huang Z.H. Identification of *Mycobacterium kansasii* by DNA Hybridization / Z. Huang, B.C. Ross, B. Dwyer // J. Clin. Microbiol. – 1991. – Vol. 29. – P. 2125-2129.

67. Kapur V. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 years old? / V. Kapur, T.S. Whittam, J. Musser // J. Infect. Dis. – 1994. – Vol. 170. – P. 1348-1349.

68. Kunze Z.M. IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium* / Z.M. Kunze, S. Wall, R. Appelberg et al. // Mol. Microbiol. – 1991. – Vol. 5 – P. 226502272.

69. Lassence A. Detection of mycobacterial DNA from patients with tuberculosis pleurisy by means of the PCR: comarison of two protocols // Thorax. – 1992. – Vol. 47. – P. 265-269.

70. Li L. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* / L. Li, J.P. Bannantine, Q. Zhang et al. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2005. – Vol. 30. – P. 12344-12349.

71. Leskiw B.K. Discovery of an insertion sequence, IS116, from *Streptomyces clavuligerus* and its relatedness to other transposable elements from actinomycetes / B.K. Leskiw, M. Mevarech, L.S. Barritt et al. // J. Cen. Microbiol. – 1990. – Vol. 136 – P. 1251-1258.

72. Mariani F. Characterization of an IS-like element from *Mycobacterium tuberculosis* / F. Mariani, E. Piccolella, V. Colizzi et al. // J. Gen. Microbiol. – 2000. – Vol. 139 – P. 1767-1772.

73. *Martin C.* Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria / C. Martin, J. Timm, J. Rauzier et al. // *Nature*. – 1990. – Vol. 345 – P. 739-743.

74. *Masaki T.* *Mycobacterium kumamotonense* sp. Nov. Recovered from Clinical Specimen and the First Isolation Report *Mycobacterium arupense* in Japan: Novel Slowly Growing, Nonchromogenic Clinical Isolates Related to *Mycobacterium terrae* Complex / T. Masaki, K. Ohkusus, H. Hata et al. // *Microbiol. Immunol.* – 2006. – Vol. 50. – P. 889-897.

75. *McFadden J.J.* Use of DNA probes to distinguish between mycobacterial species: Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis* / J.J. McFadden., R.J. Butcher, R.J. Chiodini et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 1987. – Vol. 25. – P. 796-801.

76. *Mullis K.B.* Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction / K.B. Mullis, F.A. Faloona // *Methods Enzymol.* – 1987. – Vol. 155 – P. 335-350.

77. *Murray A.* Expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses / A. Murray, N. Winter, M. Lagranderi et al. // *Mol. Microbiol.* – 1992. – Vol. 6 – P. 3331-3342.

78. *Musser J.M.* Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure / J.M. Musser, A. Amin, S. Ramaswamy // *Genetics*. – 2000. – Vol. 155 – P. 7-16.

79. *Pao C.C.* Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Amplification / C.C. Pao, T. S. B. Yen, Y.B. You et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 1990. – Vol. 28. – P. 1877-1880.

80. *Patel R.J.* Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* / R.J. Patel, J.W.U. Fries, W.F. Piessens et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 1990. – Vol. 28. – P. 513-518.

81. *Persing D.H.* Polymerase chain reaction: trenches to benches // *J. Clin. Microbiol.* – 1991. – Vol. 29. – P. 1281-1285.

82. *Public Health Mycobacteriology. A Guide For The Level III Laboratory.* Centers for Disease Control Atlanta, Georgia 30333, 1985.

83. *Ralph D.* Arbitrary Primed PCR Methods for Studying Bacterial Diseases / D. Ralph, M. McClland // *Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications.* Totowa: Humana Press. – 1998. – P. 83-102.

84. *Ridley A.M.* Genomic Fingerprinting by Application of rep-PCR // *Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications.* Totowa: Humana Press. – 1998. – P. 103-117.

85. *Rzhetsky A.* A simple method for estimating and testing minimum evolution trees / A.A. Rzhetsky, M.A. Nei // *Mol. Biol. Evol.* – 1992. – Vol. 9. – P. 945-967.

86. *Saiki R.K.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia / R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona // *Science.* – 1985. – Vol. 230. – P. 1350-1354.

87. *Saiki R.K.* Primer-direct enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase / R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel et al. // *Science.* – 1988. – Vol. 239. – P. 487-491.

88. *Savelkoul P.N.* Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art./ P.N. Savelkoul, H.J. Aarts, De Haas J. et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 37. – P. 3083-3091.

89. *Shinnick T.* The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Bacteriol.* – 1987. – Vol. 169. – P. 1080-1088.

90. *Shimodaira H.* Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference // H. Shimodaira, M. Hasegawa // *Mol. Biol. Evol.* – 1999. – Vol. 16. – P. 1114-1116.

91. *Soini H.* Detection and identification of mycobacteria by amplification of a segment of the gene coding for the 32-kDa protein / H. Soini, M. Skurnik, K. Liippo et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 1992. – Vol. 30. – P. 2025-2028.

92. *Springer B.* *Mycobacterium interiectum*, a new species isolated from a patient with chronic lymphadenitis / B. Springer,

P. Kirschner, G. Rost-Meyer et al. // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 37. – P. 3083-3091.

93. *Sreevatsan S.* Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination / S. Sreevatsan, X. Pan, K.E. Stockbauer et al. // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 1997. – Vol. 94. – P. 9869-9874.

94. *Swaminathan B.* Molecular Typing Methods. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Application. Washington / B. Swaminathan, G.M. Matar. – ASM Press, 1993. – P. 26-50.

95. *Supply P.* Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome / P. Supply, E. Mazars, S. Lesjean et al. // Mol. Microbiol. – 2000. – Vol. 36 (3). – P. 762- 771

96. *Thierry D.A.* Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis / D.A. Thierry, V. Brisson-Noel, V. Vincent-Levy-Frebault // J. Clin. Microbiol. – 1990. – Vol. 28. – P. 2668-2673.

97. *Van der Zee A.* Characterization of IS1001, an insertion sequence element of *Bordetella parapertussis* / A. van der Zee, C. Agterberg, M. van Agterveld et al. // J. Bacteriol. – Vol. 175. – P. 141-147.

98. *Victor T.* Purification of sputum samples through sucrose improves detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction / T. Victor, R. DuToit, P.D. VanHeiden // J. Clin. Microbiol. – 1992. – Vol. 30 – P. 1514-1517.

99. *Xiong L.* Use of PCR and Reverse Line Blot Hybridization Macroarray Based on 16S-23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences for Rapid Identification of 34 *Mycobacterium* Species / L. Xiong, F. Kong, Y. Yang et al. // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 10. – P.3544-3550.

100. *Yuen L.K.* Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patient by Southern blot hybridization / L.K. Yuen, B.C. Ross, K.M. Jackson et al. // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 131. – P. 1615-1618.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----|
| Введение | 3 |
| Часть 1. Методы диагностики туберкулеза | 4 |
| 1. Прижизненная диагностика туберкулеза (аллергический метод) | 4 |
| 2. Патоморфологический метод..... | 15 |
| 3. Бактериологическое исследование | 19 |
| 4. Биологический метод исследования | 26 |
| Часть 2. Культурально-морфологические, биохимические и биологические методы дифференциации и идентификации микобактерий туберкулёза | 30 |
| 1. Обзор литературы | 30 |
| 1.1. Общие сведения о микобактериях, их виды и классификация..... | 30 |
| 1.2. Методы дифференциации и идентификации микобактерий..... | 41 |
| 2. Результаты собственных исследований | 64 |
| 2.1. Материалы и методы исследования | 64 |
| 2.2. Выделение культур микобактерий от крупного рогатого скота, реагирующего на туберкулин в хозяйствах с различной эпизоотической ситуацией по туберкулезу ... | 73 |
| 2.3. Дифференциация микобактерий на питательных средах | 92 |
| 2.4. Дифференциация микобактерий при разных методах заражения лабораторных животных..... | 96 |
| 2.5. Идентификация микобактерий, изолированных из объектов внешней среды | 118 |
| 3. Обсуждение результатов исследования | 141 |
| Библиографический список | 164 |
| Часть 3. Молекулярные методы идентификации микобактерий туберкулеза | 196 |
| 1. Обзор литературы | 196 |

| | |
|--|-----|
| 1.1. Особенности молекулярного строения и функционирования микобактерий..... | 207 |
| 1.2. Мобильные элементы генома микобактерий..... | 209 |
| 1.2.1. Инсерции <i>M. paratuberculosis</i> , <i>M. avium</i> и <i>M. intracellulerae</i> : IS900, IS901 и IS1141 | 210 |
| 1.2.2. Инсерции <i>M. tuberculosis complex</i> : IS6110, IS1081 и новая IS-подобная последовательность..... | 211 |
| 1.2.3. Инсерции <i>M. smegmatis</i> : IS6120, IS1096 и IS1137 | 213 |
| 2. Материалы и методы | 214 |
| 2.1. Определение нуклеотидной последовательности..... | 217 |
| 3. Результаты собственных исследований | 219 |
| 3.1. Генотипирование изолятов <i>M. arupense</i> и <i>M. terrae</i> .. | 221 |
| 3.2. Генотипическое разнообразие <i>Mycobacterium avium</i> | 227 |
| 3.3. Генетическая характеристика изолята <i>M. tuberculosis</i> | 230 |
| 4. Обсуждение результатов исследований | 232 |
| Библиографический список | 234 |

Донченко Александр Семенович
Кисленко Виктор Никифорович
Донченко Николай Александрович
Тупота Елена Владимировна
Колычев Николай Матвеевич
Каримова Людмила Михайловна

ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЁЗА ЖИВОТНЫХ

Монография

Редактор Т.К. Коробкова
Компьютерная вёрстка Т.А. Измайлова

Подписано в печать 26 августа 2011 г. Формат 60х84 ¹/₁₆.
Объем 11,6 уч.-изд. л., 15,4 усл. печ. л.
Тираж 100 экз. Изд. № 42. Заказ № 287

Отпечатано в издательстве
Новосибирского государственного аграрного университета
630039, Новосибирск, ул. Добролюбова, 160, каб. 106.
Тел./факс (383) 267-09-10. E-mail: 2134539@mail.ru