



ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК: 579.8.083.32

ИСПЫТАНИЕ МОНОАЛЛЕРГЕНОВ ИЗ НОКАРДИЙ И РОДОКОККОВ В КОЖНЫХ РЕАКЦИЯХ

© 2011 **Нуралинов Р.А.¹, Султанов А.А.²**

¹ Дагестанский государственный университет

² Комитет по ветеринарии при Правительстве Республики Дагестан

Обнаружена аллергическая реакция на моноаллергены из нокардий и родококков у опытных животных, сенсибилизированных микобактериями и наоборот, что указывает на близкое родство антигенной структуры этих микроорганизмов.

The allergic reaction on monoallergens from *Nocardia* and *Rhodococcus* in experimental animals, sensitized by *Mycobacterium*, is discovered and, on the contrary, that shows on close relationship of antigenic structure of these microorganisms.

Ключевые слова: микобактерии, нокардии, родококки, аллергены, антиген, иммунологические реакции.

Keywords: mycobacterium, *Nocardia*, *Rhodococcus*, allergens, antigen, immunologic reactions.

Введение. Часто, в практике бактериологических исследований материалов на обнаружение микобактерий, выделяются микроорганизмы, морфологические признаки которых очень напоминают таковых у микобактерий, однако при дополнительном исследовании специальными методами, удается идентифицировать нокардий и родококков.

Экспериментальные исследования показали, что некоторые виды нокардий и родококков способны сенсибилизировать опытных животных к туберкулину. Наличие общих антигенов у микобактерий, нокардий и родококков отражалось в перекрестных реакциях клеточного и гуморального иммунитета. Эти исследования позволили рассматривать данных микроорганизмов, как весьма вероятных факторов неспецифической сенсибилизации к туберкулину.

По культуральным и морфологическим свойствам, нокардий и родококков трудно отличить от микобактерий. Поэтому для их идентификации, наряду с изучением культуральных, морфологических и тинкториальных свойств, необходимо использовать множество биохимических тестов, с помощью которых можно было бы эффективно дифференцировать выделенных культур.

Материалы и методы. Исследования показали, что в целях дифференциации микобактерий от нокардий и родококков можно с успехом использовать метод определения липида LCN-а в этанол-эфирных экстрактах с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ). Как известно, высокомолекулярные миколовые кислоты микобактерий не извлекаются данным растворителем и не выявляются по хроматограмме. Метод, предложенный Kanetsuna F. and Bartoli A.(1972), относительно легкий в исполнении и не требует больших материальных затрат и состоит из 3 этапов:

- а) получение и подготовка бакмассы;
- б) экстракция миколовых кислот;
- в) тонкослойная хроматография на силикагеле.

Выращенную на среде Сотона бактериальную массу дважды промывают дистиллированной водой (при 5000 об/мин), высушивают в течение суток при 37⁰С. После высушивания ее измельчают в ступке и навеску 400 мг заливают 4 мл 96% этилового спирта и серного эфира (в соотношении 1:1). Пробирку маркируют, оставляют на 24 часа, периодически встряхивая, и дважды меняя экстракционную смесь. Чем больше экстрагируют, тем полнее выделяются миколовые кислоты. Профильтрованные через бумажный фильтр экстракты высушивают при 34⁰С в течение 20-24 ч. Затем экстракт разводят бензолом из расчета 0,3 мл на 400 мг исходной бактериальной массы и 0,01 мл этого раствора наносят в точку «старта», на расстоянии 2,5 см от края пластинки и 1,5 см друг от друга. На пластинке отмечают фронт подъема растворителя 13,5 см. После прохождения системы растворителя пластинку вынимают, переворачивают и высушивают под вытяжкой 20 минут. Эту процедуру повторяют еще 2



раза. Глубина погружения пластинки в растворитель должна быть не более 0,5 см. Исследования показали, что наилучшее разделение пятен липида происходит в системе, состоящей из 50 мл гексана, 50 мл эфира и 2 мл ледяной уксусной кислоты.

Пятна липида выявляют обработкой пластинки 10% спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты. Для подтверждения наличия пятен липида LSN-A, параллельно, не проявленные пластинки помещают в сосуд с метанолом.

После того как метанол достигает отмеченного уровня, пластинку высушивают 2-3 мин и опрыскивают фосфорно-молибденовой кислотой. Затем ставят в сушильный шкаф для проявления при температуре 105°C в течение 10-12 минут. В качестве контроля используют музейный штамм *N.asteroides*.

Для родовой дифференциации *Nocardia* и *Rhodococcus* использовали 2 теста: определение арилсульфатазной активности (через 2 недели выращивания культур) и определение анаэробного усвоения глюкозы (тест Hugh R., Leifson E.). Как известно, родококки не обладают арилсульфатазной активностью, а нокардии не способны анаэробному усвоению глюкозы.

Анаэробное усвоение кислорода определяют на среде, состоящей из следующих компонентов: пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 0,5 г; глюкоза – 5,0; бромкрезолпурпур – 0,02; агар – 1,0; вода дистиллированная – 500 мл; pH среды устанавливают – 7,0. Компоненты растворяют, разливают в пробирки, заполняя 2/3 часть. Стерилизуют 20 минут при 125°C. Перед использованием среду пропаривают 10-15 минут для удаления растворенного кислорода, а затем ставят в холодную воду для затвердевания. Посев производили погружением петли с исследуемой культурой до дна пробирки. Затем пробирки заливали стерильным парафином толщиной слоя 25 мм и инкубировали 5 дней при температуре 37°C.

Изменение малинового цвета индикатора на желтый, по всей длине пробирки, указывало на анаэробное образование кислоты.

В сомнительных случаях, в качестве дополнительного теста дифференциации нокардий от родококков использовали метод определения их устойчивости к митомицину-С. Родококки проявляют устойчивость к этому антибиотику.

Результаты сравнительного изучения способов очистки и концентрации активного белка из культуральной жидкости после 2 месячного выращивания *N.asteroides*, *R.bronchialis* показали, что наиболее приемлемым является способ осаждения хлористым натрием в концентрации 15-20% и при pH – 3,9 – 4,1.

Результаты исследований. Многие исследователи предлагают использовать для дифференциации аллергических реакций на туберкулин моноаллергены, изготовленные из одного вида атипичных микобактерий, который чаще всего выделяется от животных и наиболее распространен в объектах внешней среды.

Аналогично этому, нами была предпринята попытка получить аллергены из нокардий и родококков, а затем испытывать их на сенсибилизированных животных.

Испытание аллергенов проводили на кроликах, зараженных музейными культурами микобактерий, нокардий и родококков, а также выделенными из патматериалов, реагировавших на туберкулин животных культурами *N.asteroides*, *N.brasiliensis*, *N.transvalensis*, *R.eritropolis*, *R.bronchialis*. Каждой культурой заражали по 3 кролика, подкожно, в область брюшка, введением 10 мг влажной культуры в физиологическом растворе.

Динамику кожных аллергических реакций на тот или иной сенсиитин изучали через 30, 60 и 90 дней после заражения. Полученные данные отражены в таблице 1.

Как видно, через месяц после заражения на оба аллергена реагировали кролики почти всех групп. На гомологичные заражению аллергены реакции были интенсивнее выражены, чем на гетерологичные. Они наблюдались также на оба аллергена у кроликов зараженных родококками, но интенсивность реакций больше проявлялась на сенсиитин из нокардий. При исследовании через 2 месяца после заражения, реакции на туберкулин сохранились только у кроликов зараженных микобактериями и у одного животного инфицированного *N.transvalensis*. У этого кролика реакция сохранилась до конца наблюдений. В остальных группах кролики реагировали только на нокардиозный аллерген.

Аналогичной была картина и при исследованиях через 90 дней, однако интенсивность реакций была высокой, чем при предыдущих исследованиях. За время наблюдений, на туберкулин не реагировали кролики, зараженные музейной культурой *N. vassinii* и выделенной культурой *R. eritropolis* и *R. bronchialis*. У всех этих животных были отмечены реакции на нокардиозный аллерген.



Таблица 1

Динамика проявления аллергических реакций на туберкулин и нокардиозный аллерген у экспериментально зараженных кроликов

№ п/п	Вид заражаемой культуры	Интенсивность реакций (в мм ²) при исследовании через _____ дней					
		30		60		90	
		ППД-туберкулин	Аллерген из нокардий	ППД-туберкулин	Аллерген из нокардий	ППД-туберкулин	Аллерген из нокардий
1	М.БЦЖ	171,7+14,4	101,5+57,5	193,5+78,5	187,1+62,5	215,0+0	-
2	M.avium	114,7+92,7	134,3+56,7	345,0+0	253,5+91,5	-	-
3	M.scrofulaceum	157,3+52,4	110,3+41,3	65,0+0	-	137,0+0	90,0+0
4	M.phlei	106,0+6,0	113,0+23,6	56,0+0	153,3+17,4	62,0+17,4	42,5+0
5	N.asteroides	100,0+0	196,0+56,1	-	219,0+56,0	100,0+0	62,0+0
6	N.brasiliensis	42,7+8,9	-	-	79,0+26,0	-	190,3+38,5
7	N.transvalensis	110,0+10,0	135,0+7,7	166,0+0	150,0+0	75,0+0	-
8	N.vaccinii	-	150,0+0	-	-	-	67,0+0
9	R.equi	150,0+0	-	-	50,0+0	-	208,0+97,7
10	R.bronchialis	-	-	-	67,0+11,3	-	155,0+20,0
11	N.transvalensis (в)	262,8+54,0	-	-	128,0+68,0	-	201,0+74,0
12	N.asteroides (в)	231,0+19,0	-	-	71,7+22,0	-	143,0+7,0
13	N.brasiliensis (в)	347,8+89,2	-	-	59,5+29,5	95,0+0	135,3+39,8
14	R.eritropolis (в)	-	-	-	57,8+18,4	-	181,5+31,5
15	R.bronchialis (в)	207,8+16,7	158,5+8,5	-	-	125,0+0	112,3+17,3
16	Контрольные (8 голов)	-	-	-	-	-	-

Примечание: (в) – выделенная культура.

Почти такие же результаты получили в опыте с параллельным введением ППД-туберкулина и аллергена из родококков. Наибольшая интенсивность наблюдалась в группах зараженных родококками на аллерген из R. bronchialis. На этот аллерген обнаружили самую меньшую интенсивность реакций у кроликов, зараженных микобактериями.

Исследования показали, что животные, инфицированные нокардиями и родококками, реагируют на ППД-туберкулин для млекопитающих и на аллергены, приготовленные из них. Однако наблюдалась строгая закономерность проявления повышенной интенсивности реакции на гомологичный заражению аллерген. Наличие общих группоспецифических антигенов у этих микроорганизмов проявлялась и в других иммунологических тестах (РБТЛ – реакция бласттрансформации, РСЛЛ – реакция специфического лизиса лимфоцитов, РСК – реакция связывания комплемента, РНГА – реакция непрямой гемагглютинации).

Аллергены из нокардий и родококков испытывали на больных туберкулезом животных неблагополучного по туберкулезу хозяйства (совхоз им. «Коркмасова», Карабудахкентского района РД). При проведении предварительных исследований 98% животных на ферме реагировали на туберкулин.

В опыт взяли 50 голов. Каждую серию сенситива испытывали на 10 животных. С правой стороны шеи животного, подкожно, вводили ППД-туберкулин, а с левой – аллергены из нокардий и родококков. Учет и оценку реакции давали через 72 часа после введения. При этом установили следующее: ни одно животное не реагировало на сенситин из родококков; на вторую и третью серии нокардиозного аллергена также не реагировали; 5 из 10 – во второй и 2 из 20-в третьей группе реагировали на туберкулин; одно животное в первой группе реагировало на оба аллергена; в четвертой группе на туберкулин реагировали 4 животное, а 3 из них – на нокардиозный аллерген. Средняя интенсивность реакций на туберкулин составляла 4,7±0,09, на нокардиозный аллерген – 4,0±0,07. Эти исследования также подтвердили данные, полученные в экспериментальных условиях.

Обсуждение. Таким образом, исследования показали, что при индикации различных культур из биоматериалов, используя методы выявления микобактерий, часто обнаруживаются колонии с похо-



жей морфологией. Детальная идентификация этих культур на основе исследования комплексом биохимических тестов показали, что часто среди выделенных штаммов обнаруживаются не микобактерии, а нокардии и родококки. Поэтому, при микробиологических исследованиях биоматериалов на обнаружение микобактерий выделенных культур, следует идентифицировать хотя бы в пределах родов, поскольку может создаться ложное представление в определении видов выделенных штаммов.

Исходя из этих соображений, в практике аллергических исследований, для дифференциации неспецифических реакций на туберкулин, нам представляется перспективным создание комплексного аллергена из атипичных микобактерий (КАМ) с широким спектром антигенной структуры, в состав которого можно дополнительно внести сенситины нокардий и родококков.

УДК: 578.824.11

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОЗОАРЕАЛА БЕШЕНСТВА

© 2011 **Нуратинов Р.А.**

Дагестанский государственный университет

В статье дается история бешенства в России и в мире, характеризуется смертность различных животных от бешенства и особенности ее распространения в горных странах.

The article gives rabies's history in Russia in the world. Mortality of animals against rabies and how it spread in the mountainous country are characterized.

Ключевые слова: Бешенство, распространение, смертность.

Keywords: Rabies, spread, mortality.

Бешенство известно человеку более 5 тысяч лет. Целенаправленную работу по изучению бешенства начали только в 40-50-х годах XX века (Карпов, 1961). Первая крупная вспышка бешенства в Европе произошла во Франконии в 1271 году (среднее течение Рейна и бассейн Майна). Упоминается о том, что бешеные волки в тот период нападали на людей и животных во многих городах и селах этой исторической области (Ведерников, 1987).

Крупные эпизоотии бешенства среди лисиц и волков происходили в 1590 г. во Франции, в 1658-60 гг. в Ирландии, в 1708 г. в Германии, в 1719-25 гг. – во Франции и Германии. В 1803-1830 гг. лисье бешенство охватило Французские Альпы, Южную Германию, Гессен, Гонновер, Австрию, Швейцарию. Однако, к 1850 г. лисье бешенство в Европе перестало наводить панику среди населения. Отмечают, что произошла спонтанная ликвидация эпизоотии (Ведерников, 1987; Селимов, Winkler, 1975). Единственным местом, где не укоренились очаги бешенства, является островная Британия, хотя бешенство волков и лисиц в континентальной Европе было известно издревле.

Первые сведения о заболевании людей и собак бешенством в России относятся к 1534 и 1677 годам (Сидоров, 2002), а официальным свидетельством о регистрации болезни является указ Анны Ивановны (1739), касающийся бешеной собаки, забежавшей в летний царский дворец. О случаях появления «бешеной скотинки» у кочевых племен Западной Сибири и Казахстана, покусанных волками, упоминает Карпов С.П. (1961), однако, вплоть до XIX в. бешенство «мелких» псовых (корсаков, шакалов, енотовидных собак) на территории России не обнаружено.

Эпизоотии с заболеванием лисиц бешенством были отмечены в России в 1810-1818 гг. и в 1824 г., последовавшие после вспышек, возникших в Центральной Европе. Хотя бешенство собак и волков регистрировалось постоянно, однако, вплоть до 20-х годов XX века бешенство корсаков, шакалов, енотовидных собак не зарегистрировано. Известно, что в течение 36 лет (1886-1922 гг.) ежегодно в России в среднем от бешенства умирало 145 человек, однако, ни один из них не погиб после контакта с лисицей (Елкин и др., 1968). Палавандов Г.В. (1928) упоминает о том, что хотя случаи укусов людей лисицами были, но все они, кроме одного случая, заканчивались благополучно.

На территории Нижнего Поволжья, Сибири, на Дальнем Востоке и в азиатской части дореволюционной России и бывшего СССР в большинстве случаев бешенство устанавливали у волков (Ведерников, 1987; Рудаков, 1971; Сидоров, 1995). Почти до середины XX века хозяевами и переносчи-