

На правах рукописи

ДЮСЕНОВА ГУЛЬЗАЙРА МУХАМЕДЖАНОВНА

**ПРИМЕНЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ
ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

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

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Дюсенова

Новосибирск-2006

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте бруцеллеза и туберкулеза животных СО РАСХН

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Ошепков Владимир Григорьевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор
Сидоров Геннадий Николаевич

кандидат ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
Донченко Николай Александрович

Ведущая организация: **Всероссийский научно-исследовательский институт пантового оленеводства (ВНИПО)**

Защита состоится «__» _____ 2006 г. в «__» часов на заседании диссертационного совета Д. 006.045.01 в ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН по адресу: 630501, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, п. Краснообск, СО РАСХН, ИЭВСиДВ

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО РАСХН

Автореферат разослан «__» _____ 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Логинов С.И.

2006А
1877

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В системе противотуберкулезных мероприятий решающая роль отводится диагностике, так как успех борьбы с этой антропо-зоонозной инфекцией во многом зависит от полного и своевременного выявления источников возбудителя болезни. Между тем, многолетний опыт использования традиционных методов диагностики туберкулеза выявил ряд свойственных им недостатков. Основной метод массовых исследований - туберкулиновая проба, не выявляет в стаде всех больных туберкулезом животных. Это вынуждает проводить многократные повторные исследования, что значительно затягивает сроки оздоровления неблагополучных стад (М.К.Юсковец, 1965; В.П.Урбан, 1982, 1991, 1998; Н.П.Овдиенко, 1980, 2001; А.С.Донченко, 1980, 1994, 2001; Л.М.Ходун, 1985, 1987, 1988; А.Х.Найманов, 1991, 1993; Н.А.Шкиль 1991, 1995; Ю.И.Смолянинов, 1994, 1995; Ю.А.Макаров, 1997; В.Н.Кисленко, 1998 и др.).

При исследовании животных в хозяйствах, считающихся благополучными по туберкулезу, в случае выявления реагирующих на ППД-туберкулин животных требуются дополнительные уточняющие исследования.

Несовершенство методов дифференциальной диагностики этого заболевания приводит к тому, что ежегодно на мясокомбинаты сдаются тысячи голов крупного рогатого скота, реагирующих на ППД-туберкулин, подозреваемых в заражении, но во многих случаях не являющихся больными туберкулезом, а это неизбежно увеличивает прямые и косвенные потери животноводства.

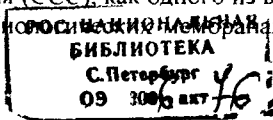
Современные достижения зарубежной и отечественной науки в области молекулярно-клеточной биологии и медицины открывают возможности в создании нового поколения средств и методов диагностики туберкулеза с высокой чувствительностью и специфичностью.

В этом плане перспективны биофизические методы, позволяющие разработать эффективные способы прижизненной диагностики туберкулеза, одним из которых является биохемилюминесцентный анализ (А.И.Журавлев, 1961, 1968, 1975; Ю.А.Владимиров с соавт., 1966, Г.М. Баренбойм с соавт., 1966; Е.И.Шущая, 1979; Н.К.Куликов, В.Ю.Куликов, 1985 и др.).

Биохемилюминесценция - свечение живых организмов и биосубстратов, превышающее их равновесное тепловое излучение за счет энергии экзотермических биохимических или химических процессов, протекающих в целостном организме, его тканях и органах (А.И.Журавлев, 1974).

Это объективно существующее явление, свойственное всем живым организмам, и может быть использовано для изучения клеточно-молекулярных механизмов, происходящих как в норме, так и при различных патологиях, в том числе и инфекционного происхождения (Ганелина И.Е., 1965; Левицкий О.Н., 1970; Гаспарян С.А., 1970 и др.).

Главные энергетические преобразования, обуславливающие возникновение и колебания сверхслабого свечения (ССС), как одного из видов биохемилюминесценции (БХЛ), происходят в биосистемах и тканях - важней-



ших супрамолекулярных структурах, являющихся субстратом основных жизненных процессов.

Сверхслабое свечение обладает некоторыми особенностями: оно универсально, свойственно всем тканям животных и растительных организмов; энергию для сверхслабого свечения поставляет процесс неферментативного свободнорадикального окисления тканевых липидов: интенсивность его в норме очень низка, так как свободнорадикальное окисление в живых тканях тормозится системой тканевых антиоксидантов; основным энергетическим субстратом являются жиры и липиды. Белки, аминокислоты, а также их водные растворы практически не хемилюминесцируют; сверхслабое свечение не оказывает прямого воздействия на интенсивность клеточного деления; спектр ССС захватывает область длин волн 360-800 нм; его можно измерить объективным физическим методом с помощью чувствительных фотоэлектронных установок (Журавлев А.И., Журавлева А.И., 1975).

Характер хемилюминесценции (ХЛ) в норме и при функциональных сдвигах, возникающих под действием бактерий, качественно отличается. Под действием патогенных бактерий и их метаболитов фагоцитирующие клетки крови взрывообразно продуцируют высокоактивные частицы кислорода, имеющие целью убить и подготовить к полноценному фагоцитозу микробы (Ю.А.Владимиров, О.А.Азизова, А.И.Деев, 1991).

В зависимости от типа и длительности вирусного и бактериального стимула продукция свободных радикалов ® может быть различной по интенсивности и объему. В острой фазе бактериальной инфекции тканевые фагоциты и лейкоциты продуцируют, как правило, максимальное количество радикалов (Е.В.Рябиченко, В.М.Бондаренко, В.В.Рябиченко, 2000). Массированный выброс свободных радикалов из клеток приводит к необратимому повреждению не только микробов, но и клеток и тканей организма-хозяина (В. И. Петухов, 2000; А.Г.Шахов с соавт., 2003 и др.).

С тем, чтобы предотвратить опосредованную активными короткоживущими радикалами самодеструкцию клеток-фагоцитов и воспалительное повреждение окружающих тканей, в организме происходит выброс ферментов антирадикальной защиты. Антиоксиданты уменьшают количество продуктов свободнорадикального окисления и тем самым регулируют интенсивность ХЛ живых организмов и биосубстратов (А.И. Журавлев, 1959, 1975; Б.Н.Тарусов, 1962; З.Бак, 1963).

Высокая эффективность применения этого биофизического теста в биологии и медицине, актуальность проблемы дифференциальной диагностики туберкулеза предопределили направленность наших исследований.

Работа является самостоятельным разделом комплексной темы 02.01.09 «Разработать теоретические и практические основы молекулярно-генетической диагностики туберкулеза животных. индикации микобактерий из различных объектов», выполняемой во ВНИИБТЖ.

Цель и задачи исследований. Цель - изучить хемилюминесценцию иммунокомпетентных клеток крови лабораторных и сельскохозяйственных жи-

вотных, и ее применение для прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

- разработать методику выделения иммунокомпетентных клеток периферической крови для хемилюминесцентных исследований;
- определить уровень сверхслабого свечения (ХЛ) лейкоцитов лабораторных животных, экспериментально зараженных *M.bovis*;
- определить уровень сверхслабого свечения лейкоцитов телят, экспериментально зараженных *M.bovis*;
- определить уровень сверхслабого свечения клеток крови коров, экспериментально зараженных *M.bovis*, и установить влияние ППД-губеркулина для млекопитающих на их хемилюминесценцию;
- испытать специфичность и чувствительность иммунохемилюминесцентного способа диагностики туберкулеза в производственных условиях.

Научная новизна. Разработан способ прижизненной диагностики туберкулеза, включающий выделение полиморфноядерных лейкоцитов, сохранение их в стабилизирующем растворе, сравнительную оценку спонтанной и индуцированной люминолзависимой хемилюминесценции; в качестве индуктора «дыхательного взрыва» используют опсонизированный зимозан; отличающийся тем, что в качестве специфического индуктора используют туберкулезный антиген; дезинтеграцию микобактерий проводят ультразвуком.

Получен патент РФ и две положительные формальные экспертизы ФИПС.

Практическая ценность. Применение способа прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота, основанного на хемилюминесценции клеток крови, индуцированных антигеном микобактерий туберкулеза, сократит сроки дифференциальной диагностики и предупредит значительный экономический ущерб за счет необоснованной сдачи на убой здоровых животных, реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих.

Составлены методические рекомендации для прижизненной диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота с использованием иммунохемилюминесцентного метода (2005 г.).

Результаты научно-исследовательской работы используются в учебном процессе на кафедрах микробиологии, вирусологии, иммунологии, эпизоотологии и инфекционных болезней сельскохозяйственных животных ИВМ ОмГАУ.

Апробация полученных результатов. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета ВНИИБТЖ (1996-2005), выездных заседаниях Президиума Сибирского отделения Россельхозакадемии (1998, 2000), Всероссийской научной конференции по проблемам хронических инфекций (Омск, 2001); годичных собраниях Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (1999, 2002), на межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 175-летию аграрной науки Сибири (2003); заседании Бюро отделения ветеринарной медицины Россельхоза-

кадемии (2003), IV-межрегиональной научно-практической конференции по проблемам ветеринарной медицины (2005), Международной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина-2005».

Материалы диссертации, выводы и практические предложения доложены, обсуждены и рекомендованы к защите на межлабораторном заседании сотрудников ВНИИБТЖ (2005).

Публикация материалов исследований. По материалам диссертации опубликовано 7 научных статей.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 127 страницах компьютерного набора и включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, практические предложения, список литературы и приложение. Список литературы включает 213 источников, в т.ч. 29 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 9 таблицами, 31 рисунком.

На защиту выносятся :

1. Экспериментальные основы выделения, сохранения и применения для хемилюминесцентных исследований иммунокомпетентных клеток крови лабораторных и сельскохозяйственных животных.

2. Результаты применения хемилюминесценции иммунокомпетентных клеток крови лабораторных животных и крупного рогатого скота для прижизненной диагностики туберкулеза в экспериментальных и производственных условиях.

Выражаю искреннюю благодарность сотрудникам лабораторий диагностики и микробиологии туберкулеза, клеточной биотехнологии ВНИИБТЖ за участие и помощь при выполнении данной работы.

2.СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Настоящая работа выполнена в лаборатории диагностики и микробиологии туберкулеза и лаборатории клеточной биотехнологии ВНИИБТЖ

Материалом для ХЛ исследований служили пробы крови лабораторных животных (морские свинки и кролики), молодняка крупного рогатого скота и коров, находящихся в эксперименте, и в хозяйствах с различной эпизотической ситуацией по туберкулезу.

Пробы крови у крупного рогатого скота брали общепринятым методом из яремной вены с трилоном Б в силиконизированные пробирки. У кроликов кровь брали из ушной вены, у морских свинок под неглубоким наркозом - из сердца. Стандартизировали концентрацию лейкоцитов путем подсчета клеток в камере Горяева.

Антигенный комплекс, использованный при постановке хемилюминесценции, получен из *M.bovis* шт.8 и *M. tuberculosis* H₃₇Rv путем дифференци-

альной дезинтеграции бактериальной массы ультразвуком и биохимического фракционирования клеточных оболочек (Л.М Ходун, Н.И.Цунская и др., 1989).

Специфичность и активность полученных антигенов проверяли в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и реакции связывания комплемента (РСК) с нормальной сывороткой здорового кролика, положительной туберкулезной сывороткой от кролика, гипериммунизированного убитой культурой микобактерий туберкулеза бычьего вида (*M.bovis*), и с положительной бруцеллезной сывороткой Антигены считали пригодными, если РНГА и РСК с туберкулезной сывороткой были положительными, а с нормальной и положительной бруцеллезной сывороткой – отрицательными

Остальные компоненты для ХЛ исследований готовили по методикам, разработанным во ВНИИБТЖ в 1995-2002 гг.

Приготовление люминола. Люминол (люминол-гидразид-3-фталевой кислоты) растворяли горячим раствором NaOH на дезинтеграторе УЗДН-2. Устанавливали pH 7,2.

Приготовление зимозана опсонизированного для определения функциональной (фагоцитирующей) активности клеток. Взвешивали необходимое количество зимозана на аналитических весах, заливали концентратом раствора Хэнкса, кипятили. Затем его опсонизировали пулом сыворотки от здоровых коров из благополучных по туберкулезу хозяйств.

Приготовление стабилизирующего раствора. В стандартной питательной среде Хэнкса без фенолового красителя последовательно растворяли бычий сывороточный альбумин и глюкозу на магнитной мешалке с подогревом до 50°C.

Постановка реакции. В сухие полистироловые кюветы термостабируемого барабана хемилюминометра разливали компоненты реакции, регистрировали по соответствующей программе спонтанную и индуцированную ХЛ. Контролем служили образцы клеток крови здоровых животных, не реагирующих на ПИД-туберкулин, с добавлением стабилизирующего раствора.

Для регистрации сверхслабого свечения компонентов крови использовали хемилюминометр серии CL3604 (Россия), выполненный в виде единого конструктива и работающий под управлением ПЭВМ типа IBM XT/AT, предназначенный для исследования кинетики хемилюминесценции биологически активных объектов.

Результаты регистрировали в абсолютных значениях – число импульсов в секунду. Сопоставление полученных данных проводили в относительных показателях превышения уровня хемилюминесценции опытных и контрольных проб.

Цифровые данные обрабатывали методом математической статистики с использованием коэффициента достоверности по таблице Стьюдента (А.Т.Усович, П.Т.Лебедев, 1970).

Методики экспериментов и научно-производственных опытов изложены в соответствующих разделах диссертации и автореферата.

2.2. Выделение клеток крови и определение их максимальной хемилюминесценции

На первом этапе изучения хемилюминесценции необходимо было провести оптимизацию способов выделения популяции лейкоцитов, определения их жизнеспособности и функциональной активности в зависимости от концентрации этих клеток, чистоты их субпопуляций, условий и времени хранения.

При изоляции субпопуляций лейкоцитов сравнивали три способа: дифференциальное центрифугирование в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-верографина, осаждение лейкоцитов в растворе декстрана Т-500; центрифугирование с предварительным гипотоническим лизисом эритроцитов и максимальным удалением гемоглобина.

В результате установлено, что наиболее подходящим для практического применения является 3-й способ, так как он более прост, не требует дорогостоящих реактивов и в то же время позволяет повысить выход жизнеспособных лейкоцитов на 30-35% по сравнению с известными способами и предотвращает их склеивание.

В многочисленных лабораторных опытах также установлено, что число жизнеспособных лейкоцитов, необходимых для получения приемлемых результатов, должно колебаться в пределах 90-95% от их общей субпопуляции.

Выяснено, что для получения сопоставимых результатов следует иметь их концентрацию в исследуемом образце, равную 2×10^6 кл/мл.

Эксперименты также показали, что субпопуляция полученных лейкоцитов лучше сохраняется, если их суспендировать в стабилизирующей буферной среде, содержащей наряду с оптимальным солевым раствором питательной среды Хэнкса глюкозу и бычий сывороточный альбумин.

Определено важное значение для проявления хемилюминесценции чистоты субпопуляций лейкоцитов. Присутствие в их взвеси гемоглобина и элементарных нерастворимых микроструктур клеток негативно влияет на уровень сверхслабого свечения.

При изучении влияния температуры и времени хранения лейкоцитов на интенсивность и продолжительность их свечения установлено, что при хранении образцов крови до измерения ХЛ при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ свечение клеток крови почти полностью угасает через 2 часа, а при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ снижение интенсивности их свечения на 60 % происходит в течение 8 час. Оптимальным с момента взятия крови до исследования ХЛ является время, не превышающее 4-х час.

2.3. Хемилюминесценция иммунокомпетентных клеток крови лабораторных животных, экспериментально зараженных *M. bovis*

Для сравнительного изучения ХЛ у интактных животных и животных, больных туберкулезом, первоначально было проведено заражение патогенными микобактериями морских свинок и кроликов.

Заражение лабораторных животных проводили в 5 повторностях по 2 морские свинки *M.bovis* шт 14 в дозе 0,01 мг в 1 мл растворителя, по 2 кролика - в дозе 0,5 мг в 1 мл растворителя. Контролем служили здоровые морские свинки и кролики.

При выполнении исследований на лабораторных животных основное внимание было уделено соотношению уровня свечения интактных клеток с уровнем свечения фагоцитирующих клеток после добавления зимозана; оптимизации концентрации и активности антигена для специфической индукции свечения; сопоставлению интенсивности хемилюминесценции клеток крови после взаимодействия с зимозаном и туберкулезным антигеном.

В результате было установлено, что антигены *M.bovis* и *M.tuberculosis* проявляют оптимальную специфическую активность в разведении 1:100. При добавлении антигена в разведениях 1:50 или 1:200 мы регистрировали сравнительно низкий уровень свечения клеток крови.

В ходе исследований было выяснено, что для оценки жизнеспособности и потенциальной функциональной активности лейкоцитов целесообразно использовать дрожжевой фермент зимозан, способный индуцировать *in vitro* 5-20-кратное увеличение неспецифической хемилюминесценции клеток крови. При этом определено, что лучшие результаты дает опсонизированный зимозан, то есть предварительно обработанный пулом нативной сыворотки крупного рогатого скота. Если сопоставлять индуцирующую активность опсонизированного зимозана и туберкулезных антигенов, то следует признать, что у дрожжевого фермента она оказалась значительно выше. Эти различия связаны с потенциальным объемом поверхностных клеточных структур, участвующих в квантовом свечении.

В конечном итоге в опытах на морских свинках и кроликах было установлено, что уровень хемилюминесценции лейкоцитов у интактных и экспериментально зараженных возбудителем *M.bovis*, хотя и различается, но менее выражено - всего лишь в 1,9-2,7 раза, чем у лабораторных животных, зараженных *M. tuberculosis* (соответственно в 2,1- 4,9 раза) (табл. 1).

Таблица 1 - Уровень ХЛ лейкоцитов лабораторных животных, экспериментально зараженных *M.bovis* и *M.tuberculosis*, имп./сек.

Исследуемые животные	Антиген <i>M.bovis</i> шт. 14	Антиген <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv
Морские свинки		
Заражен. <i>M.bovis</i>	4532±19,6*	1800±5,7
Заражен. <i>M.tuberculosis</i>	1572±19,6	8712±39,7*
Контрольная группа	1623±3,7	1754±75,3
Кролики		
Заражен. <i>M.bovis</i>	1941±23,1*	716±8,8
Заражен. <i>M.tuberculosis</i>	961±35,2	1440±6,0*
Контрольная группа	1020±25,4	684±8,6

Примечание: *P<0,001 уровень достоверно значимых различий между подопытными и контрольными группами.

Такие различия в активности хемилюминесценции клеток крови морских свинок и кроликов связаны, по нашему мнению, либо с отличиями в вирулентности шт.14 M. Bovis и H₃₇Rv M. Tuberculosis, либо, что более вероятно, с физиологическими особенностями этих видов животных.

2.4. Хемилюминесценция лейкоцитов крови телят, экспериментально зараженных M. bovis

В эксперименте использовали 4-х телят четырехмесячного возраста, содержащихся в условиях изолятора ОПХ ВНИИБТЖ. Три из них были заражены дробно в два дня M.bovis шт. 8 в дозе 0,15 мг/кг живой массы. Опытным телятам культура задавалась per os в болусе из мучного теста. Четвертый здоровый теленок был взят в качестве контроля. Пробы крови брали из яремной вены общепринятым способом непосредственно перед заражением, в последующие 3 месяца после заражения – с интервалом в 3-4 дня.

Наблюдение за динамикой проявления аллергических реакций вели путем постановки внутрикожной туберкулиновой пробы в течение 4-х месяцев с 60-дневным интервалом. В аллергической пробе использовали ППД-туберкулин для млекопитающих производства Курской биофабрики. Реакцию учитывали через 72 часа.

Динамика развития туберкулезного процесса в организме телят по срокам исследования представлена в табл.2.

Таблица 2 - Уровень хемилюминесценции лейкоцитов телят, экспериментально зараженных M. bovis, имп./сек.

Сроки исследования	Уровень хемилюминесценции
Подопытная группа	
До заражения	30,3±4,63
После заражения:	
7-й день	111,6±7,88*
18-й день	122,3±5,69*
28-й день	204,6±10,52*
60-й день	39,3±10,17
Контрольная группа	26,83±2,6

Примечание: *P<0,001 уровень достоверно значимых различий между подопытной и контрольной группами.

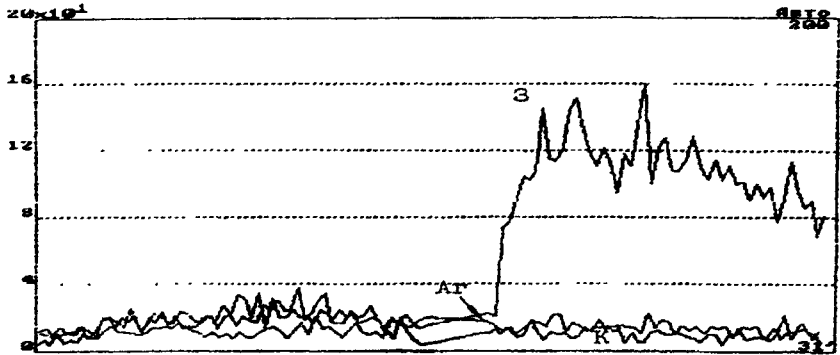


Рисунок 1 – Хемилюминесценция лейкоцитов опытного теленка №1 до заражения

По оси абсцисс время в мин.

По оси ординат – ХЛ в импульсах за 1 сек.

З – воздействие на лейкоциты зимозаном

АГ – воздействие на лейкоциты антигеном *M.bovis*

К – спонтанная ХЛ лейкоцитов

Установлено, что у опытных животных на 7-й день после заражения уровень хемилюминесцентного ответа при индуцировании специфическим туберкулезным антигеном вырос в 5,1 - 6,5 раза, на 18-й день после заражения – в 5,0-5,8 раза; к 28-у дню активность стимулированных нейтрофилов и лимфоцитов достигла пика: у 1-го опытного теленка она возросла в 8,8 раза; у 2-ого – в 7,4 раза; у 3-его – в 8,3 раза (рис.2).

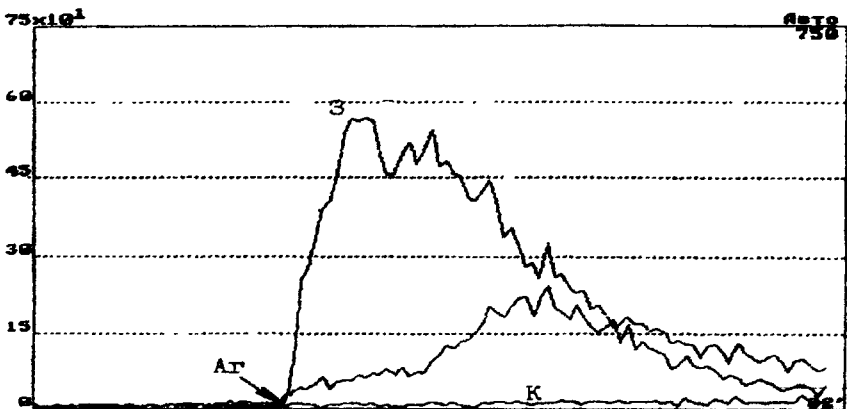


Рисунок 2 – Хемилюминесценция лейкоцитов крови опытного теленка №1 на 28-й день после заражения

В последующем отмечено снижение хемилюминесценции лейкоцитов, что свидетельствовало о снижении активности туберкулезного процесса и частичной элиминации возбудителя из организма телят (рис.3).

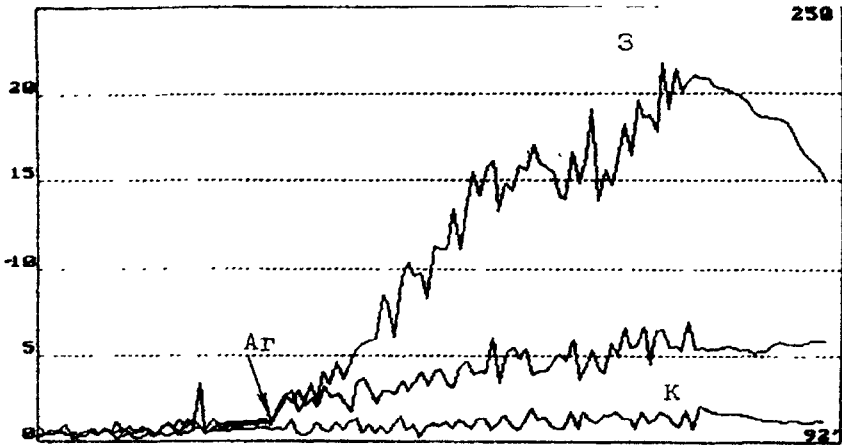


Рисунок 3 – Хемилюминесценция лейкоцитов крови опытного теленка №1 на 60-й день после заражения

Диагностический убой зараженных животных провели на санбойне мясокомбината «Омский». При патологоанатомической экспертизе внутренних органов у экспериментальных телят в заглочных лимфоузлах обнаружен туберкулезный лимфаденит. Биоматериал (подчелюстные, заглочные, бронхиальные, средостенные, портальные, мезентериальные лимфоузлы, кусочки легких) исследовали бактериологически от каждого животного в отдельности. Диагноз на туберкулез в опытной группе телят был подтвержден выделением исходной заражающей культуры.

2.5. Хемилюминесценция иммунокомпетентных клеток крови коров, экспериментально зараженных *M. bovis*, и влияние ППД-туберкулина для млекопитающих на ее уровень

Разрабатываемый нами способ ХЛ-анализа предполагает в основном использовать на фоне применения аллергической пробы. Поэтому необходимо было выяснить влияние ППД-туберкулина на уровень хемилюминесценции лейкоцитов исследуемых животных. С этой целью был проведен специальный опыт.

В опыт было подобрано по принципу аналогов две группы коров. В каждой группе было по 3 коровы черно-пестрой породы, с массой по 400-450 кг. Тип кормления смешанный. Коров опытной группы заразили подкожно взвесью музейного штамма 14 *M. bovis* в дозе 1 мг/кг массы тела. Контрольных животных не заражали и содержали на ферме ОПХ ВНИИБТЖ.

Таблица 3 - Результаты исследования ХЛ лейкоцитов у здоровых и экспериментально зараженных коров до и после туберкулинизации (внутрикожная проба ППД-туберкулином в дозе 10 тыс.МЕ), имп./сек.

Инд.№№ и кличка коров	Исследование до заражения			Исследования после заражения					
	Уровень ХЛ до туберкулинизации	Увеличение кожной складки (мм)	Уровень ХЛ после туберкулинизации	22-й день			60-й день		
				Уровень ХЛ до туберкулинизации	Увеличение кожной складки (мм)	Уровень ХЛ после туберкулинизации	Уровень ХЛ до туберкулинизации	Увеличение кожной складки (мм)	Уровень ХЛ после туберкулинизации
Опытная группа									
Земляника ¹	16	0	21	220	8	224	47	5	31
8220	23	0	19	254	7	252	54	3	46
8218	26	0	25	179	9	198	25	2	35
M±m	21,6±2,96		21.6±1,76	217,6±21,68*		224,6±15,59*	42±8,73		37,3±4,48
Контрольная группа									
8243	17	0	21	27	0	24	28	0	25
8240	23	0	19	23	0	25	26	0	26
8234	22	0	20	21	0	22	20	0	19
M±m	20,6±1,85		20±0,57	23,6±1,76		23,6±0,88	24,6±2,4		23,3±2,1

Примечание: *P<0, 005 по сравнению с контрольной группой

Аллергические исследования коров ППД-туберкулином для молокопитающих производства Курской биофабрики провели до заражения, через 22 и 60 дней после заражения.

Влияние туберкулина на ХЛ полиморфноядерных лейкоцитов подопытных животных изучали путем сопоставления уровня их свечения у опытных (3 гол.) и контрольных (3 гол.) животных до и после туберкулинизации. Повышения числа регистрируемых импульсов в секунду не отмечалось как до введения туберкулина, так и через 72 час. после туберкулинизации.

Обобщая результаты этого опыта (табл.3), можно отметить, что введение коровам ППД-туберкулина в стандартной дозе 10 тыс. МЕ не влияет на уровень ХЛ лейкоцитов крови крупного рогатого скота.

Для изучения динамики ХЛ были подобраны 10 здоровых коров чернопестрой породы. Пять из них заразили бактериальной массой культуры *M. bovis* шт.14 по 1 мг/кг живой массы. Заражение проводили дробно 2 раза в равном количестве через день. Контролем были пять здоровых коров-аналогов. Пробы крови брали от всех животных общепринятым способом из яремной вены до заражения и после заражения – с интервалом в 3-4 дня. Основные компоненты для проведения хемилюминесцентного анализа готовили, как всегда, заранее. Туберкулезный антиген использовали в разведении 1:100. Оценку результатов хемилюминесценции клеток крови проводили по данным, записанным и обработанным ЭВМ, по максимуму свечения. Показатели теста считали достоверными, если максимум ХЛ свечения клеток крови у подопытного животного после стимуляции опсонизированным зимозаном («З») превышал контроль в 5 и более раз. Туберкулинизацию проводили по общепринятой методике дозирования, на 14-й день после заражения, затем – ежемесячно.

Полученные данные показали, что у двух из пяти зараженных животных (инв.№№ 3875, 3715) уже на 8-й день после заражения зарегистрировано увеличение уровня свечения лейкоцитов в 3,7-5,7 раза к 21-му дню у первой коровы (инв.№ 3875) интенсивность ХЛ превышала исходный уровень до заражения в 2,3 раза, затем к 45-му дню она несколько снизилась и до конца опыта держалась на уровне, превышающем контроль в 1,5-1,8 раза. У второй коровы (инв.№ 3715) повышенный уровень свечения лейкоцитов стал заметно снижаться с 8-ого дня (3,7 раза) и к концу 1-ого месяца (28-й день) превышал исходное состояние лишь в 2,3 раза, а с 60-го и до конца опыта держался на уровне контроля. У коровы (инв.№ 3580) увеличение в 4,5 раза наблюдали на 8-й день после заражения, затем наступил некоторый спад, но к 29-му дню зарегистрировано повторное увеличение в 9 раз, затем до конца опыта мы наблюдали плавный спад ХЛ, который держался на уровне в 3 раза, превышающем контроль.

У коровы (инв.№ 3301) туберкулезный процесс развивался волнообразно-вначале на 8-й день зарегистрировано резкое увеличение в 10 и более раз, затем наступил некоторый спад, но в течение трех месяцев превышение свечения лейкоцитов колебалось в пределах 8,6-5,5 раза, и только к концу опыта уровень ХЛ лейкоцитов снизился до исходного уровня до заражения. Столь

резкий всплеск и длительное превышение свечения можно объяснить особенностями развития инфекционного процесса у отдельно взятого животного. У 5-ой коровы (инв. № 3940), такое же резкое увеличение наступило несколько позже – на 21-й день после заражения, затем уровень свечения лейкоцитов несколько снизился и до конца опыта (119 дней после заражения) стойко держался на уровне в 3,9-5 раз превышающем показатели здоровых животных в контрольной группе.

Важно отметить, что все опытные животные ко 2-му исследованию (через 15 дней после заражения) стали реагировать на ППД-туберкулин.

По окончании опыта зараженные животные были убиты на мясокомбинате. При патологоанатомическом исследовании установлен туберкулез с поражением подчелюстных, заглоточных и бронхиальных лимфоузлов. При бактериологическом исследовании с использованием твердых питательных сред Гельберга, Левенштейна-Йенсена, Фаст-3Л из биоматериала выделена исходная заражающая культура *M.bovis*.

2.6. Результаты испытания диагностической эффективности иммунохемилюминесцентного метода в производственных условиях

Изучение диагностической эффективности ИХЛ метода провели в 3-х хозяйствах Омской области с разной эпизоотической ситуацией.

Первоначально этот метод испытали в АО Конезавод «Омский» Марьяновского района. Хозяйство более 10 лет благополучно по туберкулезу. Противотуберкулезные мероприятия планируются и проводятся в соответствии с действующими ветеринарными и санитарными правилами, включающими организационно-хозяйственные, общие ветеринарно-санитарные мероприятия и специальные ветеринарно-диагностические мероприятия. При убое скота на мясокомбинате и последующем осмотре туш характерных для туберкулеза изменений не обнаружено. При внутрихозяйственных контрольных убоях взрослого поголовья туберкулез также исключен. При бактериологическом исследовании районной ветлабораторией патогенных микобактерий не выделено. Молодняк исследуется дважды в год ППД-туберкулином, реагирующих не выявлено. Но при аллергических исследованиях взрослого поголовья крупного рогатого скота и нетелей в этом хозяйстве систематически выявляются реагирующие на ППД-туберкулин (в 1997г.- 112 животных, в 1999 г. - 264, в 2001 г.- 143, в 2003 г. - 91).

Поэтому нами для уточнения диагноза были взяты и исследованы иммунохемилюминесцентным методом 45 проб крови от реагирующих на ППД-туберкулин коров и нетелей. Иммунокомпетентные клетки крови выделяли и исследовали по ранее разработанной методике, включающей взятие крови с трилоном Б, затем гипотонический лизис эритроцитов с последующим центрифугированием и ресуспендированием отмытых лейкоцитов в стабилизирующем растворе. Жизнеспособность и функциональную активность выделенных лейкоцитов определяли опсонизированным зимозаном. В качестве специфиче-

ского индуктора использовали антиген из клеточных стенок *M. bovis* шт. 8. Контролем служили пробы крови здоровых животных, не реагирующих на ППД-туберкулин.

Установлено, что увеличения свечения исследованных проб крови при взаимодействии с туберкулезным антигеном не происходило. Уровни исследуемых и контрольных проб находились в пределах 124-126 имп./сек. Для подтверждения благополучия (неблагополучия) наблюдаемого стада крупного рогатого стада по туберкулезу был также проведен контрольно-диагностический убой всех 45 животных с последующим бактериологическим исследованием взятого от них биоматериала. При патологоанатомической экспертизе лимфатических узлов и внутренних органов туберкулезных изменений не обнаружено. При бактериологическом исследовании культур возбудителей туберкулеза бычьего, человеческого и птичьего видов не выделено.

Но были выделены 20 культур атипичных микобактерий 3-4 групп. Из их числа 7 культур (35%) отнесены к 3-й группе нефотохромогенных микобактерий по классификации Раньона и 13 (65%) идентифицированы как 4-я группа. Выделенные атипичные микобактерии, вероятно, и послужили причиной проявления неспецифических реакций у коров и нетелей этого хозяйства.

Оставшиеся реагирующие животные (67 гол.) были повторно исследованы симультанной пробой. У 25 животных реакции на ППД-туберкулин «выпали», 42 животных прореагировали с преимуществом на КАМ.

По согласованию с Управлением ветеринарии эти животные были допущены в общее стадо без ограничений.

Таким образом, туберкулез в АО Конезавод «Омский» был исключен и предотвращен необоснованный убой коров и нетелей, получен экономический эффект в размере более 200 тыс. руб. Результаты комплексных исследований представлены в табл.4.

Такая же работа по контролю благополучия по туберкулезу была проведена и в АО «Знамя» Марьяновского района. При аллергическом исследовании 450 коров и нетелей было выявлено 21 животное, реагирующее на ППД-туберкулин. От них были взяты пробы крови и исследованы ИХЛ методом. Превышения уровня свечения исследуемых проб в сравнении с контролем не наблюдалось. При контрольно-диагностическом убое и патологоанатомической экспертизе туберкулезных изменений в органах и тканях этих животных не обнаружено. При бактериологическом исследовании биоматериала микобактерий бычьего, человеческого и птичьего видов не выделено.

Работа по определению чувствительности ИХЛ-метода также проводилась в СПК «Иконниковский» Горьковского района.

В этом хозяйстве при контрольно-диагностическом убое реагирующих на ППД-туберкулин в марте 2005 г. у 3-х коров выявлены туберкулезные изменения в заглочных и бронхиальных лимфоузлах, в связи с чем повторно были проведены аллергические исследования коров, нетелей и молодняка.

Таблица 4 – Данные комплексных исследований коров из хозяйств с разной эпизоотической ситуацией по туберкулезу

Хозяйство (АО, СПК)	Эпизоот. ситуация	Исслед. коров (гол.)	Реагиров. на ППД- туберку лин (гол.)	Убито с диаг ност. целью	Результат патолого анатомич. экспертиз	Выделены культуры	Исслед. коров ХЛ- методом (гол.)	Уровень свечения лейкоцито в исследов. коров (имп/сек.)	Уровень свечения лейкоцит.к онтрольны х коров (имп/сек.)
								M±m	M±m
Конезавод «Омский»	Благопол.	1952	116	45	Отриц.	Атипич. Микобакт 3-4 гр. по Раньону	45	126,3±1,4	130±4,05
Иконни- ковское	Неблагоп.	650	55	55	Туберкул. лимфаденит и гепатит	M. bovis	30	191±2,72	74,3±2,02

Примечание: * Благополучное хозяйство – $P > 0,1$ по сравнению с контролем

** Неблагополучное хозяйство – $P < 0,001$ по сравнению с контролем

Положительная реакция на ППД-губеркулин отмечена у 55 животных. Из них от 30 были взяты пробы крови для исследования ИХЛ-методом. Контролем служили пробы крови здоровых животных, не реагирующих на ППД-губеркулин.

В результате исследований установлено превышение уровня свечения крови у 12 (40%) из 30 животных в 1,5 – 6,9 раза по сравнению с контролем при индуцировании туберкулезным антигеном.

Затем был проведен комиссионный диагностический убой всех 55 реагирующих животных, из них у 13 (23,6%) выявлены туберкулезные изменения в заглочных, бронхиальных, средостенных лимфоузлах. У одной коровы (инв.№ 9809) выявлен туберкулезный гепатит, соответственно увеличение в ХЛ исследуемой пробы в 6,9 раза по сравнению с контролем.

Положительный результат ИХЛ метода совпал с патологоанатомическими изменениями, характерными для туберкулеза, в 8 случаях (66, 6%), у 4-х животных (13,3%) зарегистрировано увеличение свечения без видимых патологоанатомических изменений в органах и тканях.

При бактериологическом исследовании биоматериала выделены культуры *M.bovis*. Данные представлены в табл. 4.

Таким образом, испытание ИХЛ-метода в производственных условиях показало, что этот метод обладает специфичностью и определенной чувствительностью, и может быть использован в качестве дополнительного теста дифференциальной диагностики туберкулеза.

3. ВЫВОДЫ

1. Разработаны и оптимизированы методики взятия, транспортировки, хранения проб крови и выделения лейкоцитов, предназначенных для хемилюминесцентных (ХЛ) исследований в динамике инфекционных болезней животных.

2. Для получения объективных показаний при ХЛ исследованиях концентрация иммунокомпетентных клеток крови должна составлять не менее 2 млн./1 мл, их жизнеспособность и потенциальная функциональная активность достигается контролем опсонизированным зимозаном.

3. Надежность ХЛ исследований существенно повышается за счет увеличения числа жизнеспособных лейкоцитов (до 95-96%) от всей популяции, изолируемой из крови, и использования при регистрации их хемилюминесценции физиологически адекватного стабилизирующего раствора. На активность проявления хемилюминесценции лейкоцитов в исследуемом субстрате ингибирующее влияние оказывают гемоглобин и элементы разрушенных клеток.

4. Антигенный комплекс, полученный из клеточных оболочек *M.bovis* шт.8, можно использовать *in vitro* в качестве специфического индуктора хемилюминесценции иммунокомпетентных клеток крови крупного рогатого скота.

5 Введение ППД-туберкулина для млекопитающих крупному рогатому скоту в диагностической дозе 10 тыс. МЕ не оказывает влияния на показатели хемилюминесценции лейкоцитов

6. Уровень хемилюминесценции иммунокомпетентных клеток крови телят и коров, экспериментально зараженных *M. bovis*, превышает уровень хемилюминесценции клеток крови здоровых животных в 1,5-2 и более раз

7. Иммунохемилюминесцентный метод, основанный на регистрации сверхслабого свечения иммунокомпетентных клеток крови, индуцированных антигеном из клеточных оболочек *M. bovis*, обладает необходимой специфичностью и рекомендуется в качестве дополнительного прижизненного метода индивидуальной и групповой дифференциальной диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Методические рекомендации «Хемилюминесцентный метод прижизненной диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота». Предназначены для научных лабораторий, преподавателей и студентов ветеринарных факультетов. Методические рекомендации утверждены на заседании методической комиссии ВНИИБТЖ (протокол № 3 от 14 мая 2005 г.), подсекции «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол № 5 от 21 июня 2005 г.)

2. Способ выделения лейкоцитов крови для хемилюминесцентного анализа (патент РФ № 2232395 от 10.07.2004 г.)

3. Способ сохранения иммунокомпетентных клеток в стабилизирующем растворе (положительный результат формальной экспертизы ФИПС № 2004113929/13 (014817) от 05.05.2004 г.)

4. Способ прижизненной диагностики туберкулеза (положительный результат формальной экспертизы ФИПС № 2004124989/15(026935) от 16.08.2004 г.).

СПИСОК

опубликованных работ по теме диссертации

1. Использование хемилюминесцентного метода для диагностики туберкулеза в условиях эксперимента на крупном рогатом скоте / Соавт.: Л.А.Таллер / Материалы Всероссийской науч. конф. по проблемам хронических инфекций: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2001. С.176-178.

2. Использование хемилюминесцентного метода для диагностики туберкулеза в условиях эксперимента на лабораторных животных / Соавт.: Л.А.Таллер, Л.Т.Аппельганц / Инфекционная патология животных: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2001. С. 218-221.

3 Динамика возможного проявления неспецифических реакций на туберкулин у крупного рогатого скота в хозяйствах, благополучных по туберкулезу / Соавт.: Г.Ощепков, Л.А.Таллер / Инфекционная патология животных: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2001. – С.211-215.

4. О значении симультанной аллергической пробы при диагностических исследованиях крупного рогатого скота на туберкулез / Соавт.: В.Г.Ощепков, Л.А. Таллер, И.И. Овсянов // Эпизоотология, диагностика и профилактика хронических инфекционных болезней животных: Сб. науч. тр. (Матер. междунар. науч. конф., посвященной 175-летию аграрной науки Сибири, Омск, 24-26 июня 2003 г.) / СО РАСХН. ВНИИБТЖ. – Омск, 2003. – С.153-158.

5. Способы предпосевной обработки биоматериалов для изоляции L-форм микобактерий / Соавт.: Е.Ю.Секин, Л.А.Таллер, В.Г.Ощепков // Матер. междунар. науч.-конф., посвященной 175-летию аграрной науки Сибири: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2003. – С. 29-31.

6. Способ выделения лейкоцитов крови для хемилюминесцентного анализа / Соавт.: В.Г. Ощепков // Патент РФ № 2232395 на изобретение. Приоритет от 10.07.2004 г.

7 Использование биохемилюминесценции в диагностике туберкулеза у крупного рогатого скота / Соавт.: В.Г.Ощепков, Л.А.Таллер / Ветеринарна медицина: Межвід. темат. наук. збірник. – Харків, 2005. – Т.2. – С. 866-871.

ДЮСЕНОВА ГУЛЬЗАЙРА МУХАМЕДЖАНОВНА

**ПРИМЕНЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ
ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

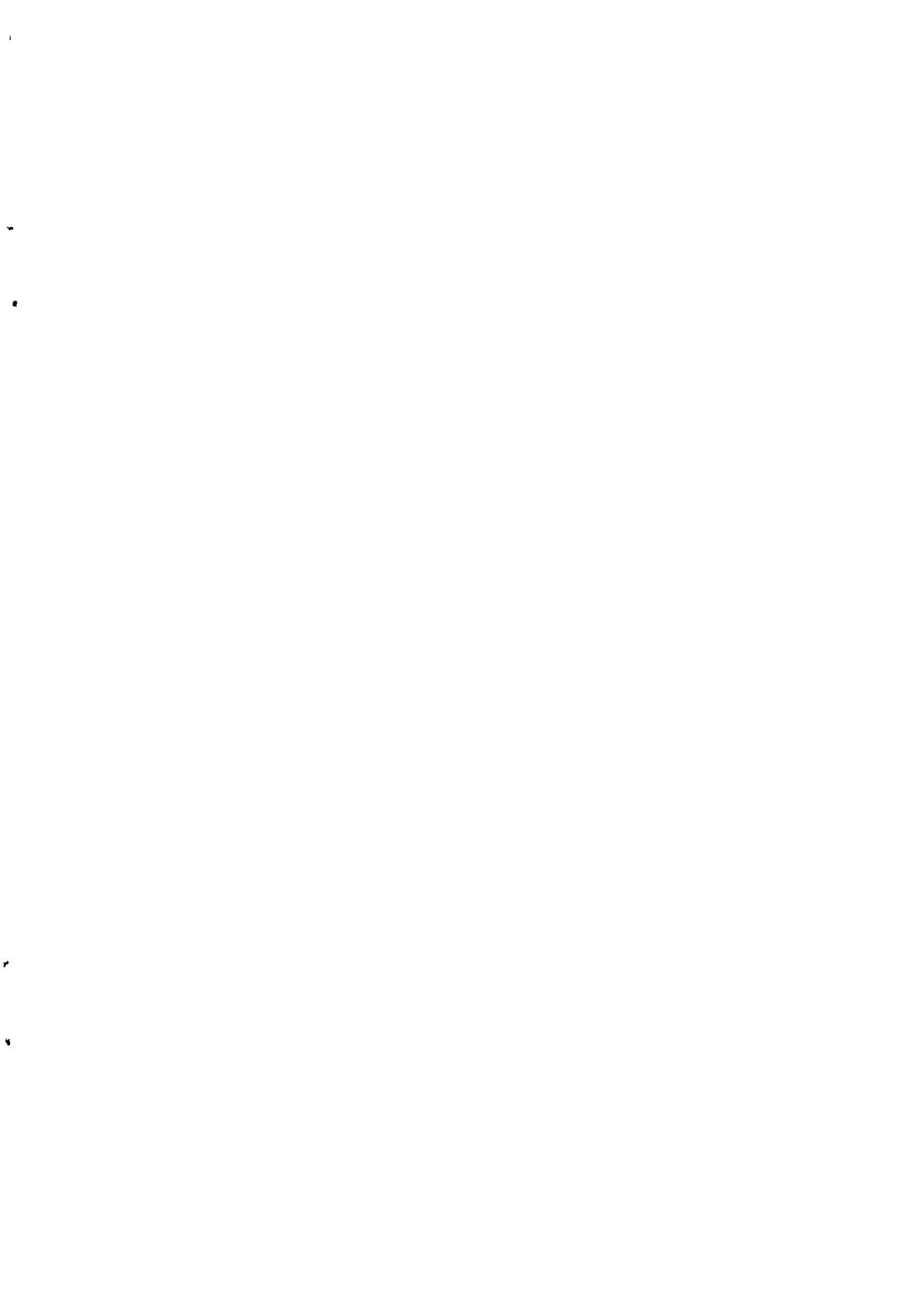
А в т о р е ф е р а т

Подписано к печати 15.01.2006. Формат бумаги 60x84 1/16.
Печать оперативная. Гарнитура Times New Roman
Усл. печ. л. 1,5. Тираж 100 экз.

Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза
и туберкулеза животных

Отпечатано с оригинал-макета
в типографии ООО «Вариант-Омск»
644034, г. Омск, ул. Коммунистическая, 45. Тел./факс: 251-434





2006A
1877

№ - 1877