

На правах рукописи

**ПАКУСИНА
ТАТЬЯНА АНАТОЛЬЕВНА**

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
МИКОБАКТЕРИОЗОВ СВИНЕЙ**

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

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**

Омск 2004

Работа выполнена в Государственном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных» СО РАСХН (ВНИИБТЖ)

Научный руководитель - доктор ветеринарных наук, профессор
ОКОЛЕЛОВ Владимир Иванович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
КРАСИКОВ Александр Пантелеевич

доктор ветеринарных наук, профессор
ШКИЛЬ Николай Алексеевич

Ведущая организация: ФГОУ ВПО «Уральская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Екатеринбург

Защита состоится 30 декабря 2004 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета Д220.050.03. при ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет» в институте ветеринарной медицины по адресу: 644122, г. Омск-122, ул. Октябрьская, 92, тел./факс 24-15-35

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет».

Автореферат разослан 29 ноября 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук, доцент



Н.П.Жабин

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В успешном развитии свиноводства важную роль играют ветеринарные мероприятия, обеспечивающие его благополучие в отношении инфекционных болезней, в том числе туберкулеза и туберкулезоподобных заболеваний, вызываемых некоторыми видами атипичных микобактерий.

Туберкулез у свиней, обусловленный бычьим и человеческими видами микобактерий туберкулеза, в ряде стран и в нашей стране встречается все реже, но участились случаи заражения атипичными микобактериями. Термин «микобактериозы свиней» в настоящее время нашел широкое распространение в специальной литературе, однако роль атипичных микобактерий в патологии свиней изучена недостаточно. В связи с переводом свиноводства на промышленную основу и при большой концентрации поголовья свиней на крупных комплексах, проблема туберкулеза и микобактериозов у свиней приобретает особую актуальность (В.П. Урбан, О.В. Мартма, 1973; П.Е. Савченко, 1974; Г.А. Юдин, 1977; И.И. Румачик, 1980; Н.Н. Козлов, 1983; А.А. Солоненко 1984; И.Т. Нечваль, 1986; П.Е. Сахончик, 1988; К. Нурмадов, 1988; М.П. Судаков, 1990; В.М. Авилов, Н.Ю. Овдиенко, В.А. Ведерников, 1997; В.И. Околелов, 2001, 2004; М.И. Гулюкин, 2004; А.П. Смирнов, 2004).

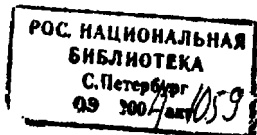
С целью охраны здоровья человека и повышения производства свинины, необходимо кроме аллергического, изыскание новых методов прижизненной лабораторной диагностики с последующей разработкой системы мероприятий по профилактике и ликвидации микобактериозов свиней.

В настоящее время диагностика туберкулеза животных традиционно основывается на проведении целого ряда исследований, включающих изучение культурально-морфологических, биохимических, антигенных и биологических свойств возбудителей, что весьма громоздко, требует значительных затрат времени, материалов и труда (В.И. Белоусов, М.В. Калмыков, Л.А. Таранова, 2004; А.Х. Найманов, 2004).

Предложенные в последние два десятилетия новые методы диагностики, в том числе ИФА, ПЦР и другие, пока находятся в стадии лабораторного и производственного испытания, и не вошли еще в повседневную ветеринарную практику.

Существенное значение в решении данной проблемы имеют методы исследований, предусматривающие применение современных приборов нового поколения, в том числе спектрофотометров, которые совмещают простоту исполнения, возможность автоматизации и компьютерное обеспечение процесса исследования.

Известно, что при развитии остро- и хронически протекающих инфекционных болезней происходит изменение состава крови. Установлена достоверная закономерность конформационных изменений, возникающих в структурах гемоглобина при развитии ряда патологий у человека и животных. В этом направлении уже имеются работы Г.В. Максимова с соавт., (1989), В.Г. Артюхова (1995), В.И. Околелова, С.П. Божко, В.Г. Ощепкова (1999), К.В. Околелова (2003), В.И. Околелова (2004) и др. Этими авторами выявлена зави-



симось конформационных изменений в структуре гемоглобина при малярии человека, лейкозе и туберкулезе крупного рогатого скота.

Анализ результатов исследований с помощью спектрофотометрических приборов и современная актуальность проблемы по изысканию прижизненных методов диагностики микобактериозов свиней предопределили цель наших исследований.

Цель исследований - изучение эпизоотической ситуации по микобактериозам на свинокомбинатах и товарных хозяйствах Омской области с последующей разработкой прижизненной диагностики микобактериозов с помощью спектрофотометрии.

Задачи исследования:

- Обследование крупных свинокомбинатов и товарных хозяйств Омской области на наличие микобактериозов у свиней.
- Определение видовой принадлежности культур атипичных микобактерий, выделенных от реагирующих на туберкулины свиней.
- Получение спектров гемолизата лабораторных животных, зараженных патогенными и атипичными микобактериями.
- Определение спектров гемолизата от свиней, зараженных *M. avium* и *avium-intracellulare* в естественных условиях и полученных от здоровых свиней.
- Дать сравнительную оценку эффективности традиционных и метода спектрофотометрии в диагностике микобактериозов свиней.
- Разработатка методических рекомендаций по диагностике микобактериозов в крупных свиноводческих хозяйствах Сибирского региона.

Научная новизна. Впервые изучена эпизоотическая ситуация по микобактериозам свиней на крупных свинокомбинатах и в товарных хозяйствах Омской области. Определен видовой состав атипичных микобактерий, выделенных от реагирующих на ППД-туберкулины животных. Установлено распространение микобактериозов среди разных пород свиней и изучены факторы передачи возбудителей. Разработаны методологические подходы к новому методу прижизненной диагностики микобактериозов свиней с использованием спектрофотометрии. В основе предлагаемого метода в эксперименте лежит изучение гемолизата крови здоровых и больных микобактериозами свиней.

Выявлена положительная корреляция между коэффициентами поглощения ультрафиолетового излучения в гемолизате крови от больных микобактериозами и здоровых свиней.

Дана сравнительная оценка традиционных и предлагаемого методов по выявлению больных микобактериозами свиней в экспериментальных и производственных условиях. За счет изменения объекта исследования гемолизата, вместо возбудителя болезни, стало возможным проведение исследования в течение дня, с учетом взятия крови у свиней в хозяйстве, доставки в лабораторию и постановки предварительного диагноза.

Теоретическая и практическая значимость работы. Дано теоретическое и экспериментальное обоснование возможности применения спектрофотометрии для прижизненной

диагностики микобактериозов свиней. Установлены различия в коэффициентах поглощения световых волн гемолизата лабораторных животных, зараженных патогенными и атипичными микобактериями, а также у больных микобактериозами и здоровых свиней.

Практическая значимость работы состоит в том, что разработаны методические рекомендации использования спектрофотометрии, которые позволяют проводить экспресс-диагностику микобактериозов свиней с высокой достоверностью и производительностью за счет автоматизации процесса исследований с помощью ПЭВМ.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Эпизоотическая ситуация по микобактериозам на крупных свинокомплексах и товарных хозяйствах Омской области. Видовой состав атипичных микобактерий, выделенных от реагирующих на ППД-туберкулины животных, распространение микобактериозов среди разных пород свиней и факторы передачи возбудителей.

2. Методологические подходы к новому методу прижизненной диагностики микобактериозов свиней с использованием спектрофотометрии.

Апробация результатов исследований. Основные положения диссертационной работы доложены: на Всероссийской научно-практической конференции по проблемам хронических инфекций животных (Омск, 2001); на научно-практической конференции, посвященной 75-летию аспирантуры ИВМ ОмГАУ (2002); на международной научно-практической конференции, посвященной 35-летию Сибирского отделения Российской академии сельскохозяйственных наук, ВНИИБТЖ (Омск, 2004); на научной конференции преподавателей и аспирантов Института ветеринарной медицины ОмГАУ (Омск, 2000-2004). Основные положения, выводы и практические предложения, изложенные в диссертационной работе, обсуждены и одобрены на межлабораторном заседании ВНИИБТЖ 24.11.2004.

Публикации результатов исследований. По материалам диссертационной работы опубликовано четыре печатных работы, в которых изложены основные положения и выводы по теме диссертации.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических предложений и приложения. Список использованной литературы включает 180 наименований, из них 57 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 10 таблицами и 14 рисунками.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Работа выполнена в лаборатории ассоциированных с туберкулезом болезней Всероссийского научно-исследовательского института бруцеллеза и туберкулеза животных (г. Омск) на крупных свинокомбинатах и товарных хозяйствах Омской области.

Тема диссертационной работы вошла самостоятельным разделом в общеинститутскую (ВНИИБТЖ) программу Российской НТП, утвержденную СО РАСХН от 19.12.2000. (№ гос. рег. - 02.01.11.01.01.) «Разработка методологических основ диагностики туберкулеза с помощью спектрофотометрии».

Для выявления распространения микобактериозов у свиней в крупных свиноводческих хозяйствах Омской области в 2000-2003 гг. были проведены аллергические исследования свиней ППД-туберкулином для млекопитающих и птиц. Свиноматок исследовали в возрасте от 2 до 4 лет, имеющих 2-5 опоросов и откормочный молодняк (8-10 мес.) в количестве 16 153 головы.

На конвейере мясокомбината «Омский», и на свинохладобойнях хозяйств послеубойному осмотру подвергнуты 5855 свиней, из них выявлено 135 туш с туберкулезоподобными изменениями в лимфатических узлах.

Изучение культурально-морфологических, биохимических, биологических свойств культур микобактерий проводили в соответствии с методическими рекомендациями «Бактериологическая и биохимическая идентификация микобактерий» (1980), согласно ГОСТу 26072-84 «Животные и птица сельскохозяйственные» и «Наставлению по диагностике туберкулеза животных» (1986,2002).

В работе использовали 81 штамм, из них 73 получены при бактериологическом исследовании секционного материала и объектов внешней среды и 8 музейных штаммов, предоставленных ВГНКИ: *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gastri*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei*.

Видовую принадлежность и патогенность исследуемых культур микобактерий определяли, заражая лабораторных животных по общепринятым методикам. С этой целью было использовано 70 морских свинок, 20 кроликов и 26 кур. Степень патогенности изучаемых культур оценивали по срокам гибели, снижению массы тела, и интенсивности поражения внутренних органов. Павших и убитых по истечении трех месяцев животных вскрывали, учитывали наличие туберкулезных изменений и проводили посев патологического материала на среду Левенштейна-Йенсена по методу Гона-Левенштейна-Сумиоши.

Патоморфологические исследования лимфатических узлов с туберкулезоподобными изменениями проводили на кафедре патологической анатомии ИВМ ОмГАУ по стандартным методикам под руководством доцента Ю.М. Гичева.

Для определения спектров гемолизата первоначально был поставлен эксперимент на морских свинках. Для проведения опыта были сформированы 6 групп морских свинок, не реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих, по 5 голов в каждой группе, 6-я группа была контрольная (интактная), с массой тела 300-350 г. Из референтных культур (*M. avium*, шт. 9, М.

intracellulare, шт. 111, *M. bovis*, шт.8, *M. smegmatis*, *M. phlei*) готовили суспензию в концентрации 500 млн. м.т. в 1 мл физиологического раствора, которую вводили морским свинкам подкожно в область паха в объеме 1 мл.

После заражения пробы крови брали у животных из области сердца по 1 мл с добавлением антикоагулянта (трилон-Б) на 5, 10, 15, 20 и 25-е сутки.

Полученную кровь разливали в стеклянные флаконы с помощью дозатора фирмы «Labsystems OY» (Финляндия) с добавлением дистиллированной воды. Затем переливали в кварцевые кюветы и проводили фотометрирование гемолизата цельной крови в диапазоне волн от 350 до 490 нм, где имеется полоса Сорэ - 420 нм, при спектральном шаге 1,00 нм, скорости интегрирования 2,00 нм/с, с временем интегрирования 0,5 с, шириной поглощения монохроматора 2,0 нм. Спектрофотометрические исследования проб крови от лабораторных животных и свиней проводили на приборе «SPECORD M-400» производства Германии.

В целом, на подготовку одной пробы и работу на спектрофотометре затрачивали 10 минут. Параллельно пробы крови исследовали общепринятыми методами. Гематологические исследования включали подсчет форменных элементов в крови и выведение лейкограммы с помощью микроскопирования в камере Горяева, мазков крови, окрашенных по методу Май-Грюнвальда.

Помимо лабораторных опытов по использованию спектрофотометрии для идентификации атипичных микобактерий, на санбойне мясокомбината «Омский» провели отбор крови у 60 свиней, давших в хозяйствах положительную реакцию на ППД туберкулин для млекопитающих и птиц и наличия на секции характерных для микобактериоза изменений в заглочных, подчелюстных, средостенных и брыжеечных лимфоузлах. Для контроля провели отбор крови от 50 свиней из хозяйств благополучных по хроническим инфекциям.

Биометрическую проверку результатов спектрофотометрического, гематологического исследования обрабатывали с помощью адаптированных программ персональных компьютеров.

2.2. Обследование свинокомбинатов и товарных хозяйств Омской области на наличие микобактериозов у свиней

В свиноводческих хозяйствах Омской области аллергическим методом исследовали 16 153 животных, из них 5812 свиноматок и 10 341 откормочного молодняка (рис. 1).

При аллергическом исследовании свиноматок в количестве 5812 голов, 319 животных или 5,4% реагировали на ППД туберкулины. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что большинство исследуемых животных реагировали на введение ППД-туберкулина для птиц - 303 головы, что составило 5,2%. Единичные реакции были на ППД-туберкулин для млекопитающих - 12 голов (0,2%) и одновременно на оба туберкулина показали 4 головы (0,06%).

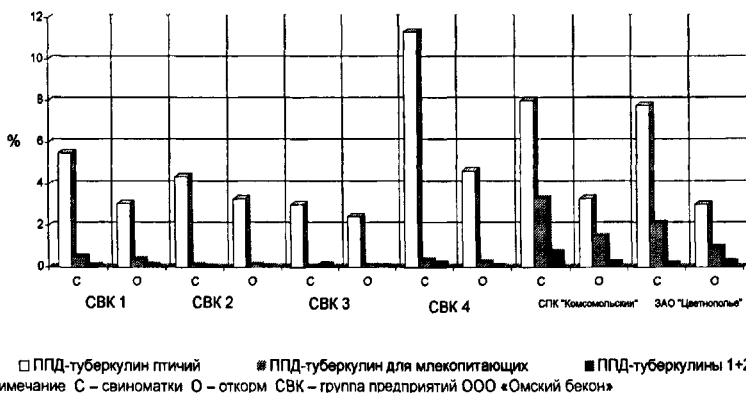


Рис. 1. Результаты аллергических исследований свиноматок и откормочного молодняка в хозяйствах Омской области

Аллергические исследования откормочного молодняка свиней в возрасте от 8 до 10 месяцев на ППД-туберкулины показали следующие результаты. Аллергическую реакцию дали 392 животных или 3,7%. Из них на ППД-туберкулин для птиц - 369 голов или (3,6%), на ППД-туберкулин для млекопитающих - 20 голов (1,9 %) и на оба туберкулина дали реакцию 3 головы (0,02%).

Следует отметить, что откормочный молодняк менее подвержен инфицированию атипичными микобактериями, чем свиноматки.

Выраженная интенсивность реакций на ППД-туберкулин для птиц указывает на инфицирование свиней атипичными микобактериями.

2.2.1. Распространение микобактериозов среди разных пород свиней

Для изучения влияния породного фактора на инфицированность свиней атипичными микобактериями провели аллергические исследования с применением ППД-туберкулинов для млекопитающих и птиц 4912 свиноматок и 10 341 голов откормочного молодняка разных пород (рис. 2.). Установлено, что у свиноматок гибридных групп (крупная белая + немецкий ландрас), (крупная белая + американский дюрок) реакция на оба ППД-туберкулина была самой высокой - 2,8%.

У свиноматок породы немецкий ландрас реакции на оба ППД-туберкулина и составили - 1,9 %. Свиноматки породы крупная белая и американский дюрок оказались менее подверженными к инфицированию атипичными микобактериями - 1,1 % и - 0,6 %.

Соответственно, откормочный молодняк гибридной породы был инфицирован на 1,4%, немецкий ландрас - 1,2% , крупной белой - 0,8% и 35 американский дюрок - 0,3%.

Полученные результаты свидетельствуют, что инфицированию атипичными микобактериями подвержены гибриды, а менее - животные породы американский дюрок.

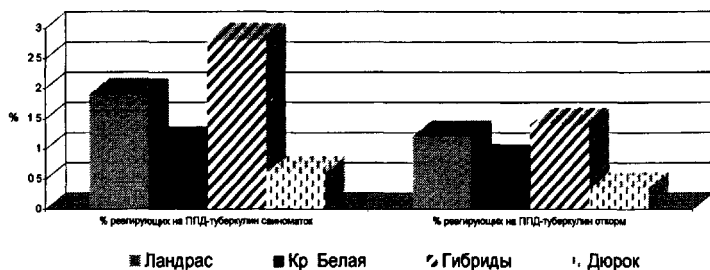


Рис. 2. Результаты аллергических исследований свиноматок и откормочного молодняка по породам

Все животные, положительно реагировавшие на ППД-туберкулины, 5855 голов были подвергнуты послеубойному осмотру на свинохладобойнях хозяйств и на мясокомбинате «Омский». Выявлено 135 туш с туберкулезоподобными изменениями в лимфатических узлах.

Изменения узелкового и диффузного характера выявляли чаще всего в брыжеечных и подчелюстных лимфатических узлах. Узелковые поражения представляли собой небольшие, диаметром до 7 мм узелки, расположенные непосредственно под капсулой лимфатического узла. Диффузные изменения сопровождались образованием крупных конгломератов, в лимфатических узлах. При разрезе обнаруживали пастообразное содержимое белого или желтовато-зеленого цвета с примесью гноя, окруженное толстостенной капсулой. В других органах видимых патологоанатомических изменений не наблюдали.

При патоморфологическом исследовании лимфоузлов установлена повышенная пролиферация клеток лимфоидной ткани фолликулов. Таким образом, изменения в лимфоузлах проявлялись гиперплазией клеток.

Патоморфологические изменения в лимфатических узлах, от свиноматок и откормочного молодняка, были аналогичными, отличались лишь степенью выраженности. Клеточных реакций, характерных для туберкулеза не обнаружили ни в одном случае.

2.2.2. Факторы передачи атипичных микобактерий в эпизоотологии микобактериозов

Для выяснения циркуляции атипичных микобактерий среди свиней провели бактериологические и биохимические исследования 633 проб биоматериала от живот-

ных с туберкулезоподобными изменениями в лимфатических узлах, в том числе 160 проб взято (кормушки, и т.д.) из предполагаемых источников заражения.

В результате бактериологического исследования было выделено 73 культуры микобактерий, из которых 47 культур изолировали из лимфатических узлов свиней. Из них 3 культуры атипичных микобактерий отнесли ко 2-ой группе по классификации Раньона, 23 к 3-ей и 21 к 4-й группе.

Из объектов внешней среды выделено 26 культур из них 5 отнесли ко 2-ой, 9 к 3-й и 12 к 4-й группе по Раньону.

2.2.3. Определение видовой принадлежности микобактерий

Для определения видовой принадлежности микобактерий заражали лабораторных животных по общепринятым методикам. Павших и убитых животных по истечении 3 месяцев после заражения вскрывали и учитывали наличие, характер туберкулезных изменений во внутренних органах и лимфатических узлах.

Для определения видовой принадлежности изолированных культур к роду *Mycobacterium* из колоний, выросших на среде Левенштейна-Йенсена, готовили мазки, которые окрашивали по Цилю-Нильсону и устанавливали наличие кислотоустойчивости у микробов изучаемого штамма, а также его чистоту. Популяции комплекса *avium - intracellulare* состояли из длинных, тонких, кислотоустойчивых слегка искривленных, зернистых палочек.

Быстрорастущие микобактерии, отнесенные к 4-й группе по классификации Раньона, имели разнообразную морфологию, которая зависела от их видовой принадлежности. Эти микобактерии обладали более выраженным полиморфизмом, некоторые из них теряли кислотоустойчивость и окрашиваются в сине-голубой цвет.

Для определения культуральных особенностей из исследуемых культур микобактерий готовили суспензии густотой 2-3 мг/мл, которые засеивали в объеме 0,2-0,3 мл на 8 пробирок со средой Левенштейна-Йенсена и инкубировали в термостатах при разных температурных режимах (22, 37, 45, 52°C). Рост учитывали через 3, 5, 7, 14 дней и далее в течение трех месяцев.

Культуры считали быстрорастущими, если рост колоний появлялся до 7-ого дня инкубации, при температуре 37°C и по интенсивности и характеру роста совпадал с ростом контрольных штаммов. К медленнорастущим относили микобактерии, у которых рост появлялся через 7 дней со дня постановки эксперимента и был идентичен с контрольными штаммами. Так, в наших исследованиях к быстрорастущим культурам были отнесены 33, и к медленнорастущим - 40, рост которых появлялся на 8-18 сутки.

Одновременно, у субкультур определяли характер роста и пробу на фотохромогенез. Для этого из суспензий, приготовленных для определения скорости роста, производили посевы на 3 пробирки со средой Левенштейна-Йенсена.

В результате исследований установлено, что из 40 медленнорастущих культур 12 являлись скотохромогенными, остальные 28 нефотохромогенные;

из 33 быстрорастущих - 11 образовывали пигмент, как на свету, так и в темноте, и 22 культуры были отнесены к нефотохромогенным (табл. 1).

Микроорганизмы, отнесенные к быстрорастущим, росли в виде мелких, средних, круглых единичных колоний, гладких, слизистых или крошковатой консистенции, морщинистых с неровными краями с ярко выраженной пигментацией или без нее, т.е. характер роста определялся их видом.

Таблица 1. Культуральные свойства атипичных микобактерий, выделенные из биоматериала и источников заражения

Наименование	Атипичные микобактерии			
	Медленнорастущие		Быстрорастущие	
	Скотохром.	Нефотохром.	Скотохром.	Нефотохром.
Кол-во культур	12	28	11	22
Скорость роста	8-16	8-16	3-5	3-5
Отношение к свету пигмент.	Оранж.	Нет пигмента	Желто-оранжевый	Нет пигмента
Рост при t=				
22°	+	+	+	+
37°	+	+	+	+
45°	-	+(15)-10	+(-4)	-
52°	-	-	-	-
Рост на ср. Лев.-Йен с солиц. Na	+	+	+	+
Рост 0,2% ПАСК	+	+	+	+
5% хлорид Na	-	-	+	+(-3)
Рост на МПБ	-	-	+	+

При посеве изучаемых культур на МПБ рост отмечался у всех культур. У быстрорастущих - на 3-5 день в виде поверхностного или придонного роста.

Из исследованных 73 культур по скорости и характеру роста на МПБ - 33 культуры были отнесены к быстрорастущим 4-й группы по Раньону, которые с помощью биохимических тестов распределились следующим образом: *M. smegmatis* - 12, *M. fortuitum* - 11, *M. pfeif* - 10 культур.

К медленнорастущим отнесли 40 культур, из них ни одна не образовывала пигмент на свету, следовательно фотохромогенных микобактерий 1-й группы по Раньону не было. К скотохромогенным отнесли 3 культуры (*M. gordonae* - 2, *M. scrofulaceum* - 1) 2-й группы по Раньону, они образовывали колонии оранжевого цвета, как на свету, так и в темноте. К нефотохромогенным медленнорастущим 3-й группы отнесли 23 культуры из них *M. avium* - 8, *M. intracellulare* - 9, *M. gastri* - 6 (табл. 2).

Следует отметить, что на свинокомбинатах и товарных хозяйствах Омской области от реагирующих на туберкулины свиней, выделяли преимущественно нефотохромогенные микобактерии 3-й группы по Раньону. Установлено, что атипичные микобактерии широко распространены в объектах внешней среды.

Таблица 2. Биохимические свойства микобактерий выделенных из биоматериала и объектов внешней среды

Вид микобактерий	Число штамм.	Нац. проба	Рдукт. нитрат.	Амид. ряд	Гидрлиз Твин-80	Арил-сульф.	Термос-таб. ката-лазы	Разрушен ПАСК до
<i>M. gordonae</i>	2	-	-	2	+	+	+	-
<i>M. scrofulaceu</i>	1	-	-	1	+	+	+	-
<i>M. avium</i>	8	-	-	3	-	-	+	-
<i>M. intracellul.</i>	9	-	-	3	-	-	+	-
<i>M. gastri</i>	6	-	-	5.6	+	+	-	-
<i>M. smegmatis</i>	12	-	+	1-6, 9	+	+	+	-
<i>M. fortuitum</i>	11	-	+	1.3.8.	+4(-4)	+	+	+
<i>M. pfliei</i>	10	-	+	3.5.6.	+	+	+	-

2.3. Методологические подходы к использованию спектрофотометрии для диагностики микобактериозов свиней

Проведенные ранее в лаборатории ассоциированных с туберкулезом болезнью ВНИИБТЖ исследования по изучению спектров гемолизата от здоровых и больных лейкозом и туберкулезом коров с помощью спектрофотометрии (В.И. Околелов, С.П. Божко, В.Г. Ощепков, 1998, К.В. Околелов, 2003) выявили разницу в спектрах поглощения, что позволило в дальнейшем экспериментально обосновать разработку нового метода диагностики лейкоза и туберкулеза крупного рогатого скота.

Исходя из этого, мы провели собственные изыскания по выбору диапазона волн для получения характерных спектров у здоровых свиней и инфицированных атипичными микобактериями.

В результате экспериментов установлено, что гемолизат свиней по спектрам отличается от гемолизата крупного рогатого скота. Если гемолизат, полученный от здоровых коров, показывал на длинах волн от 190 до 610 нм пять пиков поглощения: 284; 358; 422; 546 и 581 нм, то в гемолизате свинок регистрировался только один характерный пик в области 415420 нм.

Этот вывод позволил нам сконцентрировать внимание на более узком диапазоне волн от 350 до 490 нм, где имеется полоса Соре 415-420 нм и не проводить исследования с 190 нм (область дальнего ультрафиолета) до 610 нм (область видимого света), тем самым сократить в дальнейшем время исследований. Область пика 415420 нм дает представление о состоянии порфириновой части оксигемоглобина. Поэтому изменения конформационного, и тем более денатуративного характера гемоглобина четко выражались в увеличении коэффициента поглощения гемолизата зараженных животных.

В ходе спектрофотометрии гемолизатов, взятых для исследования в разных разведениях (1: 100, 1: 200, 1: 300, 1: 400, 1: 500), было определено, что раз-

ведение 1:400 является оптимальным, так как дает возможность регистрировать коэффициенты поглощения световых волн в наиболее удобных для обработки значениях от $1,66 \pm 0,14$ до $3,15 \pm 0,11$.

Ориентируясь на данные В.Г. Артюхова (1995), мы считаем, что пики (максимумы поглощения) спектров гемолизата были вызваны структурными комплексами гемоглобина. Морфологические изменения конформационного характера в данных структурах выражались изменениями интенсивности поглощения, что отразилось в спектре гемолизата опытных и контрольных животных.

2.3.1. Спектры гемолизата лабораторных животных, зараженных патогенными и атипичными микобактериями

Опыты показали (рис. 3), что спектры гемолизата крови от морских свинок, зараженных *M. avium* (шт.9), имеют характерный пик в области 415 нм с коэффициентом поглощения на 5-е сутки после заражения 1600, на 10-е - 2000, на 15-е - 2100, на 20-е и 25-е - 2600 условных единиц (у. е.). Гемолизат от здоровых морских свинок (контроль) составил на протяжении всего периода $2233 \pm 33,3$.

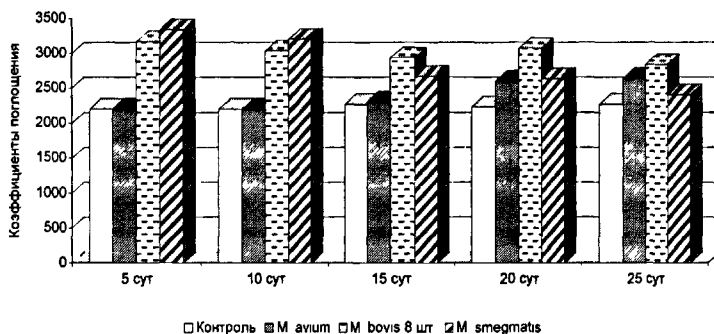


Рис. 3. Спектры гемолизата морских свинок, инфицированных микобактериями

В отличие от спектров *M. avium* (шт. 9), спектры гемолизата крови от лабораторных животных, зараженных *M. bovis* (шт. 8), имеют характерный пик на 5-е сутки после инфицирования 3500, на 10-е - 2400, на 15-е - 2400, на 20-е - 3000 и соответственно на 25-е - 2700 у.е.

Установлено, что за исключением гемолизата от животных, зараженных *M. avium* в спектрах гемолизата морских свинок, зараженных *M. bovis* (шт. 8) и *M. smegmatis*, на 5-е сутки регистрировался характерный пик для каждого штамма по сравнению с контролем. Напряженность коэффициентов поглощения сохранялась до 25 суток. Самый высокий пик в спектрах гемолизата наблюдался на 5-е

сутки, затем он постепенно снижался. Спектры гемолизата от инфицированных морских свинок *M. avium* отличались от всех вышеперечисленных тем, что повышение характерных пиков регистрировали только на 15-25-е сутки.

Анализ полученных спектров гемолизата и морфологических показателей крови от морских свинок, инфицированных патогенными и атипичными микобактериями, позволил выявить определенные закономерности, происходящие в организме лабораторных животных.

Лейкограммы, полученные от лабораторных животных, зараженных *M. avium* на 5-10 сутки, показали незначительное увеличение лимфоцитоза не более чем в 0,1-0,2 раза по сравнению с контролем. И только начиная, с 15 по 25 сутки, наблюдалась стойкая тенденция роста лимфоцитоза, разница с контролем в среднем составила 1,1 раза.

Кроме того, начиная с 5-х суток, наблюдалась тенденция к снижению количества сегментоядерных нейтрофилов, в то время как количество эозинофилов было повышенным по сравнению с контролем в 0,5 раза. Содержание моноцитов в крови животных всех опытных групп не имело достоверных различий.

В спектрах гемолизата от морских свинок, инфицированных *M. bovis* (шт. 8), на 5-е сутки установлен наибольший пик по спектрам за счет увеличения лимфоцитов по сравнению с контролем в 1,3 раза. Наблюдался сдвиг нейтрофильного ядра влево за счет увеличения содержания палочкоядерных нейтрофилов и тенденция к снижению количества сегментоядерных нейтрофилов.

2.3.2. Спектры гемолизата от свиней, инфицированных *M. avium* и комплексом *avium-intracellulare*

При изучении спектров поглощения гемолизата от свиней инфицированных *M. avium* и комплексом *avium-intracellulare* установлено, что имеется характерный пик в области 415 нм с коэффициентом поглощения 1800-2300 у. е., контроль составил 1200-1600 (рис. 4).

Анализируя гематологические показатели от свиней, инфицированных атипичными микобактериями по лейкограмме, мы установили, что наблюдается выраженный лимфоцитоз и эозинофилия.

Количество лимфоцитов по сравнению с контрольными животными увеличивается в 1,2 раза, что, по всей видимости, связано с мобилизацией защитных сил организма в ответ на действие возбудителя болезни. Повышение в 1,5 раза количества эозинофилов можно рассматривать как аллергическую реакцию на присутствие чужеродного агента.

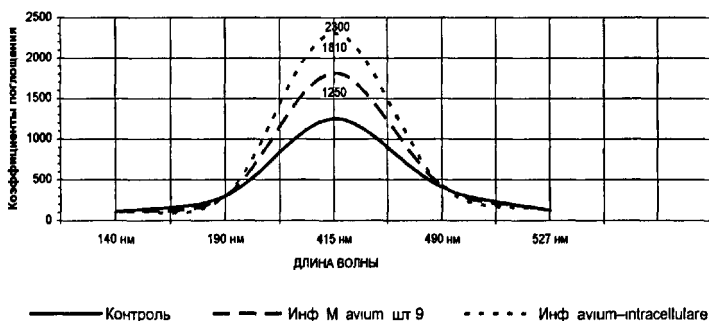


Рис. 4. Спектры гемолизата свиней в области длины волны 415-420 нм

2.3.3. Сравнительная оценка эффективности традиционных и разработанного методов диагностики микобактериозов свиней

Для сравнения эффективности спектрофотометрии и общепринятых методов, постановки диагноза на туберкулез с применением методов идентификации микобактерий были проведены соответствующие исследования, включающие изучение тинкториальных, культурально-морфологических, биохимических и патогенных свойств культур, выделенных от опытных животных.

Установлено, что общепринятые методы позволяют дифференцировать культуры на микобактерии туберкулеза, а атипичные микобактерии отнести к различным группам по Раньону, но все они длительны по времени исполнения.

Проведенные исследования еще раз подтверждают, что для идентификации микобактериальной культуры необходимо проводить весь комплекс исследований. При этом минимальным сроком идентификации можно считать 2-3 месяца. Исключительно, для определения вида микобактерий ни один из проведенных тестов не может быть использован.

В то же время, параллельно приводимые испытания по использованию спектрофотометрии для прижизненной диагностики туберкулеза показали, что предварительный диагноз по спектру гемолизата от инфицированных атипичными микобактериями свиноматок или откормочного молодняка можно получить в течение 10 минут с момента взятия крови. На рис. 5 указаны минимальные и максимальные коэффициенты поглощения гемолизата от здоровых и больных микобактериозами свиней при длине волны 415-420 нм.

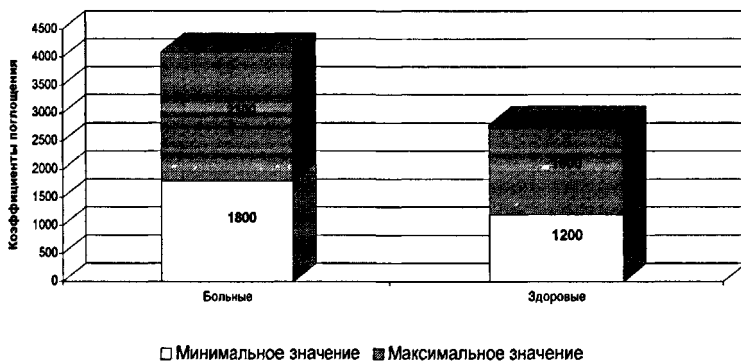


Рис. 5. Спектры поглощения гемолизата от здоровых и больных микобактериозом свиней при длине волны 415-420 нм

ВЫВОДЫ

1. В крупных свиноводческих хозяйствах Омской области регистрируются микобактериозы свиней. Свиноматки реагировали на ППД-туберкулины для птиц и млекопитающих от 3,1 до 11,8%, откормочный молодняк от 2,4 до 4,8%. Среди свиноматок с аллергией, оказались более подвержены инфицированию гибридные группы (крупная белая + немецкий ландрас), (крупная белая + американский дюрок) до 2,8%, на втором месте свиноматки породы немецкий ландрас до 1,9%, и на третьем - порода крупная белая до 1,1%. Менее всех были поражены животные породы американский дюрок до 0,6%.

2. При аллергическом исследовании свиней, из числа реагирующих дали реакцию на туберкулин для птиц 98% и только в единичных случаях на туберкулин для млекопитающих или на оба туберкулина. Изолированные от свиней культуры атипичных микобактерий 3-ей группы Раньона *M. avium* и комплекс *avium - intracellulare* являются для зараженных свиней патогенными и вызывают у них туберкулезоподобные изменения в лимфатических узлах брыжейки и головы.

3. Изучение 73 культур микобактерий, изолированных от реагирующих свиней на ППД-туберкулины для птиц и млекопитающих, а также из материала, отобранного от свиней на мясокомбинатах с туберкулезоподобными изменениями и из объектов внешней среды по культурально-морфологическим, биохимическим свойствам и биопробы на лабораторных животных, позволило их идентифицировать как: 33 культуры быстрорастущие 4-ой группы по Раньону (*M. smegmatis* - 12 культур, *M. fortuitum* - 11, *M. phlei* - 10), и 40 культур медленно растущие, из них 23 культуры - *M. avium* - 8, *M. intracellulare* - 9 и *M. gastri* - 6.

4. Определены методологические подходы для разработки и внедрения в ветеринарную практику нового дополнительного экспресс-метода прижиз-

ненной диагностики микобактериоза свиней, основанного на спектрофотометрии гемолизата.

5. У свиноматок, откормочного молодняка и морских свинок после инфицирования атипичными микобактериями происходят конформационные изменения в гемоглобине, которые можно регистрировать с помощью спектрофотометрии в диапазоне длин волн 415-420 нм и получать характерные спектры (коэффициенты поглощения), позволяющие отличать здоровых от зараженных животных.

6. Спектры гемолизата морских свинок, инфицированных *M. avium*, отличаются от гемолизата свинок после заражения *M. bovis* тем, что увеличение пиков поглощения регистрируется только на 15-20-е сутки после заражения животных, при этом коэффициенты поглощения составляют $2300 \pm 57,7$ $2600 \pm 25,1$. У свинок после заражения *M. bovis* шт. 8 зарегистрирован характерный пик уже через 5 суток в области 415 нм с коэффициентами поглощения 2966 ± 366 – 3166 ± 166 . У интактных (не зараженных) животных этот показатель в этот же срок не превышает- $2233 \pm 33,3$.

7. При спектрофотометрии гемолизата свиней инфицированных микобактериозами, выявляется характерный пик в области длины волны 415 нм с коэффициентом поглощения 1800 - 2300 нм (2050 ± 91). У здоровых свиноматок и откормочного молодняка, коэффициенты поглощения гемолизата при этой же длине волны достигают лишь величин 1200 - 1600 ($1400 \pm 27,7$).

8. Сравнительная оценка эффективности традиционных и разработанного методов диагностики микобактериозов свиней показало, что по спектрам гемолизата можно установить предварительный прижизненный диагноз в течение 3-6 часов, тогда как с применением общепринятых методов на это требуется не менее двух-трех месяцев.

9. В эксперименте доказана возможность применения спектрофотометрии для дифференциальной диагностики патогенных и атипичных микобактерий за счет разницы коэффициентов поглощения света в гемолизате. Спектры гемолизата морских свинок, инфицированных *M. avium* имеют пик в области 415 нм с коэффициентом поглощения $2300 \pm 57,7$ – $2600 \pm 25,1$, а больные туберкулезом бычьего вида при этой же длине волны – 2966 ± 366 – 3166 ± 166 .

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Результаты научных исследований включены в «Методические рекомендации по использованию спектрофотометрии для прижизненной диагностики микобактериозов свиней», рассмотренные и одобренные на заседании ученого совета ВНИИБТЖ (протокол № 7 от 27.10. 2004) и секцией животноводства Центра научного обеспечения АПК Министерства сельского хозяйства и продовольствия Омской области (протокол № 6 от 11.11.2004).

Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедр эпизоотологии и инфекционных болезней сельскохозяйственных животных, микробиологии, вирусологии и иммунологии ИВМ Омского ГАУ, Уральской ГАВМ, Новосибирского ГАУ.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Пакурина Т.А. Эпизоотологические аспекты и диагностика микобактериозов на свинокомбинатах / Т.А. Пакурина, В.И. Околелов // Инфекционная патология животных: сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. - Омск, 2001. - С. 252-253.

2. Околелов В.И. Сравнительная идентификация микобактерий общепринятыми методами / В.И. Околелов, Т.А. Пакурина, К.В. Околелов // Проблемы и перспективы развития науки в Институте вет. медицины: сб. науч. тр. ИВМ. - Омск, 2002. - С. 182-189.

3. Пакурина Т.А. Распространение микобактериозов свиней в Сибирском регионе / Эпизоотология, патология и ветеринарно-санитарные мероприятия при инфекционных болезнях животных // Сб. науч. тр. / СО РАСХН. ВНИИБТЖ. - Омск, 2004. - С. 62-67.

4. Пакурина Т.А. Использование спектрофотометрии для диагностики туберкулеза свиней / Т.А. Пакурина, В.И. Околелов // Проблемы ветеринарного образования и научных исследований в агропромышленном комплексе: сб. науч. тр. ИВМ ОмГАУ. - Омск, 2004. - С. 230-236.

На правах рукописи

ПАКУСИНА
ТАТЬЯНА АНАТОЛЬЕВНА

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
МИКОБАКТЕРИОЗОВ СВИНЕЙ

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Омск 2004

Рег. №6. Сдано в набор 22.11.04. Подписано в печать 26.11.04.
Печать на ризографе. Бум. офсетная. Формат 60x84/16.
Печ. Л. 1,00 (1,16). Уч.-изд. л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ 38.

Типография филиала издательства ИВМ ОмГАУ, Омск-7, Октябрьская, 92

№ 26467