

На правах рукописи

САВИЦКАЯ ОКСАНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РЕАКЦИЙ
КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

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

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

Москва – 2004 г.

Работа выполнена в ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ им. Я.Р.Коваленко)

Научные руководители:

доктор ветеринарных наук
А.Х.НАЙМАНОВ
доктор биологических наук
О.А.ВЕРХОВСКИЙ

Официальные оппоненты:

Заслуженный деятель науки РФ, доктор ветеринарных наук, профессор
В.А.БУРЛАКОВ
(МГАВМиБ им.К.И.Скрябина)

кандидат биологических наук,
Г.И.УСТИНОВА (ВИЭВ им Я Р Коваленко)

Ведущее учреждение:

ФГУ Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов (ФГУ ВГНКИ)

Защита диссертации состоится «29» июня 2004 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д.006.033.01 при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я Р Коваленко по адресу: 109428, г Москва, Рязанский проспект, 24/1, ВИЭВ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВИЭВ им Я.Р Коваленко

Автореферат разослан «25» июня 2004 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор ветеринарных наук,
профессор



Н.П.Овдиенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Туберкулез продолжает оставаться одной из наиболее сложных проблем инфекционной патологии в большинстве стран мира, включая Россию. Несмотря на проводимые профилактические и оздоровительные мероприятия, эпизоотическая ситуация по этой болезни остается напряженной и даже чревата осложнениями.

На современном этапе борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота основой профилактических и оздоровительных мероприятий была и остается диагностика этой болезни. В настоящее время основным и массовым методом диагностики туберкулеза является внутрикожная туберкулиновая проба (ВТП) с применением ППД-туберкулина для млекопитающих. Однако одной из важных проблем при диагностике туберкулеза ВТП является проблема неспецифических или парааллергических реакций на туберкулин. Проблемам, связанным с разработкой высокочувствительных и специфичных методов диагностики туберкулеза крупного рогатого скота, посвящены многочисленные работы отечественных и зарубежных авторов (П.П.Вишневский, 1937; С.Н.Вышелесский, 1948; М.К.Юсковец, 1965; И.В.Поддубский, 1957, 1967; М.А.Сафин, 1981; А.С.Донченко, 1981, 1994; Б.Я.Хайкин и Л.М.Ходун, 1991; Н.П.Овдиенко, 1991; А.Х.Найманов, 1993; Ю.И.Смолянинов, 1994; Ю.А.Макаров, 1997; Р.А.Нуратинов, 1998; Т.В.Гребенникова с соавт., 1999; А.Н.Шаров с соавт., 2000; L.A.Cornet, 1994; L.A.Sechi et al., 1999; R.E.Romero et al., 1999; M.J.Waters et al, 2000; C.Coetsier et al., 2000; H.Park et al., 2000; M. Amadori et al., 2002 и др.).

Тем не менее, и в настоящее время прижизненная диагностика туберкулеза крупного рогатого скота имеет две главные противоположные проблемы: с одной стороны – перевыявление, т.е. выявление здоровых животных с «парааллергическими» реакциями на туберкулин в благополучных по туберкулезу хозяйствах, а с другой стороны – невыявление зараженных туберкулезом животных в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах. Поэтому, при проведении исследований на туберкулез в благополучных хозяйствах следует повысить специфичность, а в неблагополучных – чувствительность диагностических исследований. По этой причине прижизненная диагностика туберкулеза крупного рогатого скота одной внутрикожной туберкулиновой пробой не может быть идеальным диагностическим средством. Поэтому изыскание новых, современных дополнительных методов диагностики туберкулеза животных является весьма актуальным и перспективным и на сегодняшний день.

Известно, что при диагностике туберкулеза большое значение имеют иммунодиагностические методы, направленные на оценку функциональной активности Т-лимфоцитов. Это положение обусловлено тем, что исследованиями С.Т.Торнс и Д.А.Моррис (1983) установлено, что при инфицировании млекопитающих *M.bovis* доминирующим является клеточный иммунный ответ. Дальнейшие исследования по изучению туберкулеза человека, крупного

рогатого скота и других видов животных подтвердили эту концепцию (Wood P.R, Rothel J.S., 1994; Neill S.D. et al., 1994 и др.).

Основными диагностическими методами оценки Т-клеточного иммунного ответа при туберкулезе являются внутрикожная туберкулиновая проба, реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) и разработанный сравнительно недавно (Rothel J.S. et al., 1990) «сэндвич»-ИФА на основе моноклональных антител, предназначенный для выявления γ -интерферона (γ -ИФН) в крови инфицированных животных (γ -ИФН ИФА). Все методы предполагают использование ППД туберкулина в качестве антигена, стимулирующего пролиферацию Т-клеток *in vivo* (ВТП) или *in vitro* (РБТЛ и γ -ИФН ИФА).

Внутрикожная туберкулиновая проба уже более 100 лет остается основным методом прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. В основе метода лежит реакция организма на внутрикожное введение туберкулина сенсibilизированному животному, являющаяся наиболее ярким примером гиперчувствительности замедленного типа и представляющая собой иммунологически специфическую воспалительную реакцию, обусловленную Т-клетками. Метод ВТП характеризуется высокой чувствительностью, однако основным недостатком этого метода является достаточно большой процент ложноположительных реакций, возникающих вследствие перекрестной реактивности между антигенами разных видов микобактерий.

РБТЛ является высокочувствительным методом определения специфического иммунного ответа на ППД-туберкулин для млекопитающих и оценки реактивности Т-клеток у инфицированных *M. bovis* животных. Однако длительность постановки реакции, необходимость выделения лимфоцитов из крови и использования радиоактивной метки для определения уровня клеточной пролиферации являются серьезными ограничениями для использования этого метода в клинической практике.

Достижения в области биотехнологии и иммунохимии сделали возможным применение метода ИФА для выявления и количественного определения уровня цитокинов (интерлейкинов, интерферонов, клеточных факторов, кемокинов и др.)-продуктов секреции различных типов клеток иммунной системы. Это направление интенсивно развивается и одной из наиболее показательных и успешных разработок является γ -ИФН ИФА – один из новых перспективных методов прижизненной диагностики туберкулеза.

В настоящее время этот метод наряду с ВТП является узаконенным методом диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в Австралии, Новой Зеландии и Румынии.

Теоретической основой разработки γ -ИФН ИФА является тот факт, что в крови зараженных туберкулезом животных присутствуют сенсibilизированные Т-лимфоциты, способные к специфическому распознаванию антигенов имеющих в ППД-туберкулина для млекопитающих. В процессе иммунологического распознавания происходит стимуляция Т-клеток и как следствие этого выделение цитокина- γ -интерферона, определяемого в крови методом «сэндвич»-ИФА. Обнаружение γ -ИФН свидетельствует о наличии воз-

будителя туберкулеза в организме исследуемого животного. Для получения более достоверных результатов прижизненных диагностических исследований на туберкулез, большинство авторов рекомендуют использовать комплексный метод диагностики, т.е. одновременно два метода: внутрикожную туберкулиновую пробу и γ -ИФН ИФА.

Высокая чувствительность и специфичность γ -ИФН ИФА была подтверждена при проведении широкомасштабных диагностических исследований в США, Ирландии, Испании, Аргентине, Бразилии и других странах мира (D.L. Whipple et al., 1995, 2001; M. Monaghan et al., 1997; O. R. Gonzalez Llamazares et al., 1999; T.J. Ryan et al., 2000; J.M. Pollock et al., 2000; V.M. Buddle et al., 2001; R.K. Katial et al., 2001; A.M. Perez et al., 2002 и др.).

К сожалению, в нашей стране этот метод совершенно не известен. Поэтому вопросы, связанные с изучением Т-клеточного иммунного ответа при туберкулезе крупного рогатого скота и возможности использования γ -ИФН ИФА в качестве метода прижизненной диагностики туберкулеза на территории России, являются весьма актуальными и представляют значительный интерес как в научном, так и в практическом аспектах.

Цель работы. Сравнительная характеристика и оценка диагностической ценности реакций клеточного иммунитета при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота. Изучение возможности применения γ -ИФН ИФА для прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота.

Основные задачи исследований:

1. Отработать методику постановки и учета результатов «сэндвич» - ИФА предназначенного для детекции γ -ИФН в образцах крови крупного рогатого скота. Провести сравнительную оценку отечественных и голландских ППД-туберкулинов для млекопитающих и ППД-туберкулинов для птиц, используемых в диагностике туберкулеза и определить возможность использования отечественных туберкулинов в коммерческом наборе «BOVIGAM™» (CSL Veterinary, Австралия) для стимуляции Т_H1-клеток крови in vitro.

2. Изучить динамику формирования Т-клеточного иммунного ответа у экспериментально зараженных *M. bovis* телят. Для этого с помощью «сэндвич»-ИФА определить уровень γ -ИФН в крови зараженных туберкулезом животных в процессе постинфекционного иммуногенеза.

3. Провести сравнительное изучение диагностической ценности внутрикожной туберкулиновой пробы и γ -ИФН ИФА при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота в благополучных и неблагополучных по туберкулезу хозяйствах РФ.

4. Изучить возможность применения γ -ИФН ИФА для дифференциации неспецифических реакций при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота в благополучных по туберкулезу хозяйствах.

Научная новизна работы.

Впервые проведена сравнительная оценка голландских и отечественных ППД- туберкулинов для млекопитающих и ППД- туберкулинов для птиц и показана возможность использования отечественного ППД- туберку-

лина для млекопитающих и ППД- туберкулина для птиц в коммерческом наборе «BOVIGAM™» для стимуляции Т_H1-клеток крови *in vitro*.

Комплексными исследованиями с использованием ВТП и γ -ИФН ИФА изучена динамика формирования Т-клеточного иммунного ответа у экспериментально зараженных *M. bovis* телят. Получены новые данные о сроках появления и максимального содержания γ -ИФН в крови зараженных туберкулезом животных в процессе постинфекционного иммуногенеза.

Впервые в РФ проведены сравнительные испытания ВТП и γ -ИФН ИФА при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота в благополучных и неблагополучных по туберкулезу хозяйствах. Установлена высокая специфичность метода γ -ИФН ИФА с использованием голландского ППД-туберкулина для млекопитающих и ППД-туберкулина для птиц при исследовании животных после предварительно проведенной туберкулинизации отечественным аналогом.

Установлена возможность применения γ -ИФН ИФА для дифференциации аллергических реакций на туберкулин в благополучных по туберкулезу хозяйствах.

Практическая значимость исследований.

Метод γ -ИФН ИФА целесообразно использовать как дополнительный метод прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота для дифференциации неспецифических реакций на туберкулин в благополучных по туберкулезу хозяйствах Российской Федерации. Установленные временные показатели диагностического появления γ -ИФН в крови, могут служить ориентиром при оценке иммунного ответа животных, инфицированных *M. bovis*.

Полученные результаты являются основой для дальнейших исследований механизмов формирования иммунного ответа основных популяций Т-лимфоцитов на различные антигены или виды микобактерий.

По результатам экспериментов разработаны «Методические рекомендации по определению γ -интерферона методом иммуноферментного анализа (γ -ИФН ИФА) для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота» рассмотренные на заседании Ученого совета института и утвержденные директором ВИЭВ.

Основные положения, выносимые на защиту.

Полученные экспериментальные данные позволяют вынести на защиту следующие основные положения:

- результаты экспериментов по изучению динамики формирования Т-клеточного иммунного ответа у экспериментально зараженных *M. bovis* телят и определению уровня γ -ИФН в крови зараженных туберкулезом животных в процессе постинфекционного иммуногенеза;
- результаты сравнительных исследований по определению диагностической ценности ВТП и γ -ИФН ИФА в качестве методов прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в благополучных и неблагополучных по туберкулезу хозяйствах РФ.

Апробация работы.

Основные положения диссертационной работы доложены на:

- 6-м Международном симпозиуме по ветеринарной иммунологии, Швеция, Уппсала, 2001;
- Международной научно-практической конференции «Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных», Москва, 2003;
- Межлабораторном совещании сотрудников ВИЭВ, Москва, 2004.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано пять научных работ.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 123 стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов исследований, заключения, выводов, практических предложений, списка цитированной литературы. Материалы диссертации иллюстрированы 15 таблицами и 7 рисунками. Список литературы включает 175 источников (12 отечественных и 163 зарубежных авторов).

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 2000-2003 гг. в лаборатории микобактериозов, лаборатории иммунологии и биотехнологии и на опытной базе Вышневолоцкого отдела ВИЭВ, в благополучных и неблагополучных по туберкулезу хозяйствах РФ.

1.1. Антигены микобактерий

В исследованиях использованы ППД- туберкулин для млекопитающих (1 мг/мл) и ППД- туберкулин для птиц (25,000 ед.) выпущенные в Central Veterinary Institute, Lelystad, Нидерланды и любезно предоставленные профессором J.D.Collins (UCD, Ирландия). Также в работе были использованы отечественные ППД- туберкулин для млекопитающих и ППД- туберкулин для птиц производства ФГУП «Курская биофабрика».

Для экспериментального заражения подопытных телят использован вирулентный штамм *M. bovis* «8».

1.2. Экспериментальные животные

Опыт по изучению динамики формирования постинфекционного Т-клеточного иммунного ответа проведен на 9 телятах сформированных в две группы (опытная и контрольная) по принципу аналогов. Животные первой группы (n=6) были заражены вирулентной культурой *M. bovis*, животные второй (n=3)- служили контролем.

Заражение 6 экспериментальных телят проводили алиментарно, четырехкратно в дозе 0,2 мг культуры *M. bovis* на кг живого веса животного при каждом заражении, т.е. каждому теленку было введено более 80 мг культуры *M. bovis*. Первые три введения культуры *M. bovis* (в дозе 20 мг/животное) про-

водили ежедневно, четвертое – проводили через 7 суток после третьего в той же дозе и тем же способом.

Для изучения динамики Т-клеточного иммунного ответа у экспериментально зараженных животных, аллергические исследования и исследования проб крови проводили в начале опыта, затем через 7-14 суток после последнего введения культуры *M. bovis*. Далее аллергические исследования методом ВТИ и исследования проб крови методом γ -ИФН ИФА проводили в динамике, каждые 30-60 суток после заражения (п.з.).

1.3. Благополучные и неблагополучные по туберкулезу хозяйства, аллергические и лабораторные исследования на туберкулез

Сравнительное изучение внутрикожной туберкулиновой пробы и γ -ИФН ИФА, а также оценку диагностической ценности указанных методов провели в трех благополучных по туберкулезу хозяйствах Смоленской и Ярославской областей, в которых установлена сенсбилизация животных атипичными микобактериями, и в одном неблагополучном по туберкулезу хозяйстве Тамбовской области.

Исследования внутрикожной туберкулиновой пробой, патологоанатомические исследования убитых животных и лабораторные исследования патоматериала от этих животных проводили в соответствии с утвержденным «Наставлением по диагностике туберкулеза животных» (1986) и в соответствии с новым «Наставлением по диагностике туберкулеза животных» (2002).

Симультанную туберкулиновую пробу проводили с использованием ППД-туберкулина для млекопитающих и КАМ (комплексного аллергена из атипичных микобактерий).

1.4. γ -ИФН ИФА, методика проведения исследований

В опытах использован коммерческий набор (BOVIGAMTM Bovine Gamma Interferon test, CSL Veterinary, Australia), предназначенный для определения γ -ИФН в крови животных с помощью «сэндвич»-ИФА и любезно предоставленный профессором J.D.Collins (UCD, Ирландия).

Постановку «сэндвич»-ИФА по определению уровня γ -ИФН в крови животных, учет и интерпретацию полученных результатов проводили по методике, рекомендованной фирмой-производителем.

Для исследования использованы пробы крови экспериментально зараженных бычков и крупного рогатого скота из благополучных и неблагополучных по туберкулезу хозяйств, полученные от каждого животного в отдельности, и доставленные в лабораторию при температуре +12°C - +20°C в течение 12-24 часов после взятия.

1.4.1. Подготовка проб для анализа

Каждую испытуемую пробу крови тщательно перемешивали и вносили в три лунки плоскодонной полистироловой 24-луночной панели для культивирования (Nunc, Дания) в объеме 1 мл/лунку. Далее в первую лунку вносили 20 мкл ФБ, во вторую- ППД-туберкулин для птиц, в третью- ППД- туберкулин для млекопитающих. Далее панели аккуратно встряхивали на шейкере в

течение 10 мин для тщательного перемешивания жидкостей в лунках, затем помещали в термостат и инкубировали в течение 18 ч при +37°C. После инкубации, пробы переносили в пластиковые пробирки и центрифугировали течение 10 мин при 2000 об/мин. и комнатной температуре. Плазму, полученную после центрифугирования, аккуратно отбирали микропипеткой и использовали для тестирования, осадок красных форменных элементов крови отбрасывали.

1.4.2. Постановка реакции

В качестве испытуемых образцов служили пробы плазмы крови после инкубации с ФБ (О), ППД-туберкулином для птиц (А) и ППД-туберкулином для млекопитающих (В). Каждая испытуемая проба, исследуемая как О, А и В, тестировалась дважды.

Для проведения ИФА во все лунки 96-луночных микропанелей, сенсibilизированных антителами к γ -ИФН крупного рогатого скота, вносили буфер для разведения (БР) в объеме 50 мкл/лунку. Далее в лунки вносили испытуемые образцы плазмы, положительный и отрицательный контроли в равных объемах (по 50 мкл/лунку соответственно) и тщательно перемешивали с буфером. Для положительного и отрицательного контролей использовали по три лунки на каждой панели. Микропанели с внесенными пробами инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, затем промывали лунки шесть раз промывочным буфером (ПБ), оставляя их заполненными буфером в течение 5 мин после каждого внесения. После отмывания микропанели подсушивали, добавляли в каждую лунку по 100 мкл рабочего разведения конъюгата и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После инкубации микропанели отмывали шесть раз как описано выше, подсушивали и добавляли свежеприготовленный раствор субстрата в объеме 100 мкл/лунку. Далее микропанели инкубировали в темном месте в течение 30 мин., затем проводили остановку реакции и учет полученных результатов.

1.4.3. Учет реакции и интерпретация полученных результатов

Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл раствора для остановки реакции (0,5 М H_2SO_4). Результаты ИФА оценивали с помощью фотометра «Multiskan MCC/340» («Labsystems», Финляндия) при длине волны 450 нм по коэффициенту оптического поглощения (ОП 450). Значения ОП 450 каждой испытуемой пробы, исследуемой как О, А и В были использованы для анализа и интерпретации полученных результатов.

Перед учетом реакции в лунках с испытуемыми пробами проводили оценку реакции в лунках с контролями, входящими в состав набора.

Результаты γ -ИФН ИФА считались достоверными если среднее значение ОП 450 (Δ ОП 450) лунок с положительным контролем превышало 0,7, а Δ ОП 450 лунок с отрицательным контролем было меньше 0,13.

Результаты γ -ИФН ИФА интерпретировали согласно схеме, рекомендованной фирмой-производителем:

Положительный результат: ОП 450 В – ОП 450 О > 0,1 и

ОП 450 В – ОП 450 А > 0,1

Отрицательный результат: ОП 450 В – ОП 450 О < 0,1 или

ОП 450 В – ОП 450 А < 0,1

Если разница между ОП 450 А и ОП 450 О превышала 0,1 и при этом разница между ОП 450 А – ОП 450 В также превышала 0,1, то результат считался отрицательным с пометкой *реакция на ППД- туберкулин для птиц*.

При получении сомнительного результата, реакцию повторяли, исследуя такую пробу трижды.

1.5. Электрофорез в ПААГ-ДСН

Опыты по сравнительному анализу белкового спектра всех используемых в экспериментах отечественных и зарубежных ППД- туберкулинов проведены методом электрофореза белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-ДСН).

Электрофорез проводили в пластинах полиакриламидного геля размером 100 x 150 x 0,75 мм в буферной системе Laemmli (1970). Все пробы содержали лизирующий буфер с восстановителем (0,125 М трис-НСl pH 6,8, 5% ДСН, 0,5% β -меркаптоэтанола, 10,8% глицерина, 0,01% бромфенолового синего) и были прогреты в течение 10 минут при 100°C. Разделение белков проводили при постоянной силе тока 20 мА и циркулирующем охлаждении. После электрофоретического разделения, белки в гелях окрашивали серебром (Potto M. et al., 1982) и фотографировали в проходящем свете.

1.6. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием программы Excel для Windows. Значение критерия достоверности оценивали по таблице вероятностей Стьюдента-Фишера в зависимости от объема анализируемого материала. Вероятность различий считалась существенной при $P < 0,05$.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. ОТРАБОТКА ПОСТАНОВКИ γ-ИФН ИФА И ВНЕСЕНИЕ ДОПОЛНЕНИЙ В МЕТОДИКУ

Основными целями первого этапа нашей работы были:

- отработка методики постановки и учета результатов γ-ИФН ИФА;
- подбор реагента для разведения конъюгата, определение условий хранения и рабочего титра готового препарата;
- изучение возможности длительного хранения испытуемых образцов плазмы крови крупного рогатого скота.

В опытах по отработке методики постановки и учета результатов γ-ИФН ИФА были использованы отрицательный и положительный γ-ИФН контроли (входящие в состав набора), ППД-туберкулин для птиц, ППД- туберкулин для млекопитающих, а также образцы плазмы крови крупного рогатого скота, полученные от клинически здоровых и больных туберкулезом живот-

ных (с подтвержденным диагнозом) и любезно предоставленные профессором J.D.Collins (UCD, Ирландия).

Результаты исследований показали, что $M \pm m$ ОП 450 лунок с отрицательным контролем составило $0,092 \pm 0,029$ и во всех экспериментах (включая последующие) было меньше $0,130$ - контрольного значения определенного разработчиками набора. При этом значения ОП 450 лунок с положительным контролем составили $2,749 \pm 0,371$ соответственно, что также соответствует критериям чувствительности и специфичности тест-системы (во всех экспериментах превышало $0,7$). Все отрицательные ($n=5$) и положительные ($n=5$) пробы, полученные от профессора J.D.Collins, были также отрицательными и положительными в наших исследованиях (100%-ная совпадемость результатов). При этом значения показателей ОП 450 В-А для отрицательных и положительных проб составили $0,007 \pm 0,013$ и $0,625 \pm 0,420$ соответственно. Помимо высокой чувствительности и специфичности, метод характеризуется быстротой постановки реакции (2,5 часа без учета времени инкубации и внесения образцов), возможностью исследования большого количества проб, воспроизводимостью результатов (r между дубликатами лунок на одной микропанели составил $0,95$).

В следующих опытах мы подбирали реагент для разведения конъюгата, определяли рабочий титр готового препарата и условия его хранения.

Таблица 1.

Результаты γ -ИФН ИФА, полученные с использованием конъюгата и образцов плазмы крови крупного рогатого скота, хранившихся в различных условиях.

№ п/п	I			II		
	Показатели ОП 450 в пробах:			Показатели ОП 450 в пробах:		
	0	A	B	0	A	B
1	0,089	0,139	0,526	0,095	0,154	0,530
2	0,072	0,114	0,148	0,078	0,112	0,161

Примечание: В таблице приведены средние геометрические значения Δ ОП 450 положительных (№1, $n=5$) и отрицательных проб (№2, $n=5$).

В опыте I исследовали образцы плазмы свежеполученных проб крови крупного рогатого скота с использованием конъюгата, растворенного в БК и хранившегося при 4°C (рабочее разведение 1:100); в опыте II исследовали эти же образцы плазмы с использованием конъюгата, растворенного в БК и глицерине (рабочее разведение 1:50). Все используемые во втором опыте реагенты хранились при температуре -20°C в течение 6-ти месяцев после проведения опыта I.

Результаты исследований показали, что при разведении конъюгата глицерином («Sigma», США) в соотношении 1:1 (50%-ный конечный раствор) препарат без снижения активности и специфичности может храниться при температуре -20°C в течение 2 лет (срок наблюдения). Установлено, что ра-

бочее разведение такого конъюгата составляло 1:50, в то время как конъюгат, растворенный в буфере (БК) и хранившийся при температуре 4°C, использовали в разведении 1:100 (согласно наставлению по применению набора).

В этих же экспериментах была изучена возможность длительного хранения испытуемых образцов плазмы крови крупного рогатого скота и установлено, что все испытуемые О, А и В пробы каждого животного после инкубации с соответствующим антигеном могут храниться при температуре -20°C без снижения показателей ОП 450 в течение 2 лет (срок наблюдения).

Результаты проведенных экспериментов приведены в таблице 1.

Второй задачей данного раздела работы было определение возможности применения отечественного ППД-туберкулина для млекопитающих и ППД-туберкулина для птиц в наших основных экспериментах с использованием набора «BOVIGAM™».

Анализ структурного состава исследуемых аллергенов методом электрофореза в ПААГ-ДСН показал, что белковый спектр голландского ППД-туберкулина для млекопитающих практически идентичен белковому спектру отечественного аналога. Однако концентрация некоторых белков в аллергенах различна. Так в оба аллергена входят 5 белков с различной концентрацией и с молекулярной массой (М.м.) в диапазоне от 10 до 25 кД. При этом белок с М.м. 21-25 кД является доминирующим в голландском ППД-туберкулина для млекопитающих, где его концентрация составляет 85-90% от общего содержания белка. В отечественном ППД-туберкулине для млекопитающих также преобладает белок с аналогичной молекулярной массой, однако его концентрация значительно ниже по сравнению с общим содержанием белка и концентрацией этого белка в зарубежном аллергене. Второй по содержанию белок голландского ППД-туберкулина для млекопитающих имеет М.м. 17-19 кД и по своей концентрации сопоставим с содержанием белка аналогичной молекулярной массы в отечественном ППД-туберкулине для млекопитающих.

Кроме того, в оба аллергена входят три белка с различной молекулярной массой в диапазоне 10-16 кД. По результатам нескольких экспериментов нами установлено, что концентрация этих белков в отечественном ППД-туберкулине для млекопитающих несколько выше по отношению к концентрации аналогичных по молекулярной массе белков, содержащихся в голландском ППД-туберкулине для млекопитающих.

Белковый профиль отечественного и зарубежного ППД-туберкулинов для птиц практически одинаков. В состав обоих аллергенов входят 4 белка с молекулярной массой в диапазоне 15-22 кД, однако их концентрация выше в голландском туберкулине.

Следующие эксперименты были посвящены подбору оптимальных концентраций отечественного ППД-туберкулина для млекопитающих и ППД-туберкулина для птиц для антигенной стимуляции *in vitro* в сравнительном аспекте с зарубежными аналогами. Для этого, пробы крови крупного рогатого скота, полученные от ВТП-негативных и ВТП-позитивных животных, инкубировали с отечественным ППД-туберкулином для птиц и ППД-туберкулином для млекопитающих, взятыми в различных дозах. Контролем

служили эти же пробы, стимулированные голландскими туберкулинами, взятыми в рекомендованной производителем дозе – 20 мкл/мл (20 мкг/мл).

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что для постановки γ -ИФН ИФА оптимальной дозой отечественных ППД-туберкулинов для млекопитающих и ППД-туберкулинов для птиц, использующихся в качестве антигенов, стимулирующих пролиферацию Т- клеток, является доза 50 мкл туберкулина/мл крови животного. Использование отечественных туберкулинов в меньших (20 мкл/мл) или больших (100 мкл/мл) дозах могут приводить к некоторому снижению или повышению величин ОП 450 и даже к изменениям в интерпретации результатов реакции.

Результаты сравнительных экспериментов по использованию в наборе «BOVIGAM™» отечественных ППД-туберкулинов для млекопитающих и ППД- туберкулинов для птиц в установленной дозе свидетельствуют о положительной корреляции результатов полученных с использованием голландских и отечественных туберкулинов ($r=0,7-0,8$ в разных опытах, $P<0,05$) и отсутствии статистически достоверных различий при интерпретации результатов реакции.

2.2. ДИНАМИКА ПОСТИНФЕКЦИОННОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ЗАРАЖЕННЫХ *M.bovis* ТЕЛЯТ

Одна из главных задач нашей работы заключалась в изучении динамики формирования постинфекционного Т- клеточного иммунного ответа у экспериментально зараженных телят и сравнительном изучении диагностической ценности внутрикожной туберкулиновой пробы и γ -ИФН ИФА в экспериментальных условиях.

Для решения поставленной задачи был проведен опыт по экспериментальному заражению телят вирулентной культурой *M.bovis* с последующими прижизненными и посмертными диагностическими исследованиями на туберкулез. Прижизненные методы исследования Т-клеточного иммунного ответа были проведены в динамике, методами ВТП и γ -ИФН ИФА, посмертные – были направлены на подтверждение результатов заражения туберкулезом.

Прижизненные исследования животных.

В процессе постинфекционного иммуногенеза были проведены сравнительные исследования с использованием внутрикожной туберкулиновой пробы и «сэндвич»-ИФА по определению уровня γ -ИФН в крови животных. Исследования проводили на 0, 7, 14, 21, 28, 35, 65, 85, 110 и 135 сутки после заражения. После взятия крови проводили туберкулинизацию каждого теленка.

Посмертные исследования животных.

Все подопытные животные (опытные и контрольные) были убиты через год после заражения. После убоя каждое животное было подвергнуто патологоанатомическому исследованию, затем были взяты пробы патматериала (лимфатические узлы, участки паренхиматозных органов), которые достав-

ляли в лабораторию и исследовали индивидуально. Весь отобранный патматериал исследовали культуральным методом, высевая на среду Левенштейна-Йенсена и среду ФАСТ-3 л (по 5 пробирок среды на каждую пробу) и биологическим методом – подкожным введением суспензии патматериала морским свинкам (по 2 свинки на каждую пробу).

Анализ посмертных исследований телят опытной и контрольной групп позволил установить следующее. На основе результатов патологоанатомического исследования, положительный диагноз на туберкулез был поставлен двум телятам опытной группы из шести зараженных. У этих животных в бронхиальном и средостенном лимфатических узлах были обнаружены единичные очажки величиной с просыное зерно. При гистологическом исследовании патматериала в бронхиальном и средостенном лимфатических узлах обнаружены характерные гранулемы, представляющие собой узелки с округлыми краями и центром в виде некроза, при этом хорошо выражен слой эпителиоидных, лимфоидных и гигантских клеток. При проведении культуральных исследований наблюдали рост кислотоустойчивых микроорганизмов в виде мелких и гладких колоний. При биологическом исследовании материала наблюдали развитие туберкулезного процесса у всех зараженных морских свинок.

Результаты патологоанатомического исследования телят контрольной группы и лабораторных исследований отобранного от них материала были отрицательными. Результаты прижизненных исследований животных контрольной группы методами ВТП и γ -ИФН ИФА были также отрицательными в течение всего периода эксперимента.

Таким образом, на основании анализа полученных результатов патологоанатомического исследования убитых животных и бактериологического исследования посмертно отобранного материала был сделан вывод о том, что телята опытной группы заразились туберкулезом, а телята контрольной – остались здоровыми.

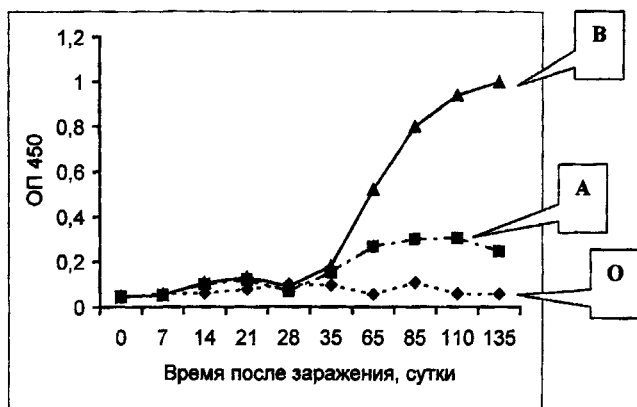
Результаты по определению динамики содержания γ -ИФН в крови телят опытной группы в процессе постинфекционного иммуногенеза представлены на рисунке 1.

Анализ материалов представленных на рис. 1 свидетельствует о том, что Т-клеточный иммунный ответ, выражающийся в синтезе γ -ИФН и обнаружении его в крови зараженных животных, формируется у всех телят опытной группы. Однако сроки обнаружения γ -ИФН методом ИФА у телят различны. Как видно из представленных данных, достоверное увеличение содержания γ -ИФН в крови зарегистрировано у теленка №1 на 35-е сутки п.з., у телят №2, №4 и №6 – на 65-е сутки п.з., у теленка №5 – на 85-е сутки п.з. и у теленка №3 – на 110-е сутки п.з. соответственно. При этом относительный уровень γ -ИФН (о нем можно судить по показателю ОП 450 В-А) в крови также отличается у разных животных. Так, самое высокое содержание γ -ИФН установлено у теленка №1 на 65-е сутки п.з. (ОП 450 В-А равен

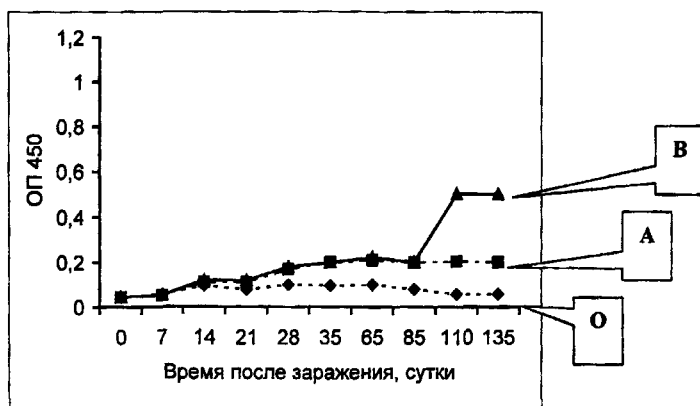
Теленок №1



Теленок №2



Теленок №3



Теленок №4



Теленок №5



Теленок №6



Рисунк 1. Динамика содержания γ -ИФН в крови зараженных телят в процессе формирования постинфекционного Т-клеточного иммунного ответа. Представлены показатели ОП 450 клеточного ответа на ФБ (О), ППД-туберкулина для птиц (А) и ППД-туберкулина для млекопитающих (В).

0,754), у теленка №4 – на 110-е сутки п.з. (ОП 450 В-А равен 0,56) и у телят №2 и №6 - на 135-е сутки п.з. (ОП 450 В-А равны 0,763 и 0,95 соответственно). Уровень γ -ИФН в крови телят №3 и №5 был значительно ниже по сравнению с аналогичными значениями у других животных, и на 110-е сутки п.з. показатели ОП 450 В-А этих телят достигали своих максимальных значений и были равны 0,3 и 0,44 соответственно.

Представленные данные также свидетельствуют о том, что в процессе постинфекционного иммуногенеза у телят №1, №4 и №5 наблюдалась тенденция к снижению содержания γ -ИФН в крови (после достижения своего максимального значения на 65-е и 110-е сутки п.з. соответственно), у телят №2 и №6 – к увеличению, и у теленка №3 уровень γ -ИФН в крови после достоверного повышения оставался постоянным на относительно низком уровне.

Одновременно с проведением исследований по изучению динамики формирования постинфекционного Т-клеточного иммунного ответа у зараженных телят, на этой же экспериментальной модели решалась вторая основная задача данного опыта - оценка диагностической ценности внутрикожной туберкулиновой пробы и γ -ИФН ИФА. Статистически обработанные результаты опыта с использованием ВТП и γ -ИФН ИФА в экспериментальных условиях приведены в таблице 2.

Таблица 2.

*Сравнительный анализ результатов исследований телят, экспериментально зараженных *M. bovis*, методами γ -ИФН ИФА и ВТП.*

Время п.з., сутки	Результаты γ -ИФН ИФА, количество животных		Результаты ВТП, количество животных		
	Положительных	Отрицательных	Положительных	кожная реакция (мм)	Отрицательных
0	0	6	0	-	6
7	0	6	0	-	6
14	0	6	0	-	6
21	0	6	0	-	6
28	0	6	0	-	6
35	1	5	0	-	6
65	4	2	0	-	6
85	5	1	2	5-8	4
110	6	0	4	6-10	2
135	6	0	6	6-12	0

Из данных табл.2 видно, что на 135-е сутки п.з. все животные реагировали на внутрикожное введение ППД-туберкулина для млекопитающих. У двух телят (№4 и №6) положительная реакция зарегистрирована на 85-е сутки

п.з., у двух – на 110-е сутки п.з. и у телят №3 и №5 – только в завершающей стадии эксперимента.

Таким образом можно констатировать о 100%-ной совпадаемости результатов ВТП и γ -ИФН ИФА только на 135-е сутки п.з. У всех телят диагностическое повышение уровня γ -ИФН, установленное методом ИФА, происходило на 20 – 50 суток раньше чем была зарегистрирована внутрикожная реакция после проведения туберкулинизации.

2.3. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ ВНУТРИКОЖНОЙ ТУБЕРКУЛИНОВОЙ ПРОБЫ И γ -ИФН ИФА В БЛАГОПОЛУЧНЫХ ПО ТУБЕРКУЛЕЗУ ХОЗЯЙСТВАХ

В нашей стране в соответствии с Санитарными и Ветеринарными правилами от 1996 года, все хозяйства, в зависимости от эпизоотического состояния поголовья по туберкулезу, подразделяются на две категории: благополучные и неблагополучные. Согласно этим правилам принято считать, что в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах, реагирующие на туберкулин животные, инфицированы возбудителем туберкулеза, поэтому все эти реагирующие животные подлежат изоляции от стада и вынужденному убою. В благополучных по туберкулезу хозяйствах при выявлении реагирующих животных проводят комплекс прижизненных, послеубойных и лабораторных исследований для подтверждения или исключения диагноза на туберкулез. В любом случае, заболевание животных туберкулезом считается установленным, если диагноз подтверждается данными патологоанатомического вскрытия, а при отсутствии характерных для туберкулеза видимых изменений - положительными результатами бактериологического исследования.

Целью данного раздела нашей работы являлось сравнительное изучение диагностической ценности внутрикожной туберкулиновой пробы и γ -ИФН ИФА, а также изучение возможности применения γ -ИФН ИФА для дифференциации парааллергических реакций на туберкулин при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота в благополучных по туберкулезу хозяйствах РФ, где установлена сенсibilизация животных атипичными микобактериями.

Исследования провели в трех благополучных по туберкулезу хозяйствах, где установлена сенсibilизация животных атипичными микобактериями: хозяйство №1 – ФГУП «Смоленское», Смоленского района, Смоленской области; хозяйство №2 – СХПК «Некрасовский», Вяземского района, Смоленской области; хозяйство №3 – АПК «Туношна», Ярославского района, Ярославской области.

Исследования в хозяйствах проводили совместно с представителями ветеринарной службы области, района и ветеринарных врачей данных хозяйств.

После проведения аллергических исследований и учета реакций, от всех реагирующих на туберкулин животных (и от 5-15 не реагирующих животных данного хозяйства – контрольных животных) отбирали пробы крови

и доставляли в течение 24-х часов после взятия в лабораторию иммунологии и биотехнологии ВИЭВ. Время между проведением исследований методом ВТП и γ -ИФН ИФА составило 28-35 суток.

Для постановки γ -ИФН ИФА использовали: а) в хозяйстве №1 – отечественные и голландские ППД- туберкулины для млекопитающих и ППД- туберкулины для птиц; б) в хозяйствах №2 и №3 - только голландские ППД- туберкулин для млекопитающих и ППД- туберкулин для птиц.

В хозяйстве №1 было исследовано внутрикожной туберкулиновой пробой 274 головы крупного рогатого скота. При учете реакции выявлено 5 реагирующих на туберкулин животных с утолщением кожной складки на 4-6 мм. От всех 5 реагирующих на туберкулин животных и 15 нереагирующих на туберкулин животных были отобраны пробы крови и исследованы методом γ -ИФН ИФА (табл.3).

Таблица 3.

Суммарные результаты диагностических исследований на туберкулез крупного рогатого скота в хозяйстве №1.

Результат ВТП	Количество животных	Результат γ -ИФН ИФА, количество животных	
		Положительных	Отрицательных (реагирующих на ППД- туб. для птиц)
Положительный	5	0	5 (0)
Отрицательный	15	0	15 (2)

Из материалов, представленных в таблице 3 видно, что при учете результатов исследований у всех 15 нереагирующих на туберкулин (контрольных) животных, получены отрицательные показатели и в γ -ИФН ИФА. Все пять реагирующих на внутрикожную туберкулиновую пробу животных показали отрицательный результат в γ -ИФН ИФА (значения показателей ОП 450 В-А составляли 0,043 – 0,046 соответственно). При этом была установлена 100% совпадаемость результатов реакции, полученных с использованием голландских и отечественных ППД- туберкулинов для млекопитающих и птиц. Кроме того, наблюдалась положительная корреляция в цифровых значениях показателей ОП 450 В-А, полученных с использованием данных препаратов ($r = 0,7$, $P < 0,05$).

По результатам исследований в хозяйстве № 1, провели диагностический убой трех реагирующих на внутрикожное введение туберкулина коров (с отрицательными показателями в γ -ИФН ИФА). Отобранный материал доставляли в лабораторию и исследовали культуральным и биологическим методами. При патологоанатомическом осмотре убитых коров характерных для туберкулеза изменений не обнаружили ни в одном случае. При лабораторном исследовании патматериала от убитых коров возбудителя ту-

беркулеза не выделили. Выделили быстрорастущие атипичные микобактерии IV группы по классификации Раньёна.

Таким образом, на основе полученных комплексных результатов сравнительных исследований двух прижизненных диагностических методов, можно констатировать, что в данном случае γ -ИФН ИФА в отличие от ВТП не дал ложноположительных результатов при постановке комплексного диагноза на туберкулез.

В хозяйстве № 2 плановые исследования на туберкулез проводили симультанной туберкулиновой пробой с использованием ППД- туберкулина для млекопитающих и КАМ. При исследовании 287 голов крупного рогатого скота выявлено 55 реагирующих на туберкулин животных, из них с большей интенсивностью реакции на ППД- туберкулин для млекопитающих – 15 (знак +), с меньшей реакцией – 29 (знак -), с равной реакцией – 11 (знак =). Результат симультанной пробы неопределенный. От этих 55 реагирующих животных и 5 нереагирующих животных данного хозяйства были взяты пробы крови и исследованы методом γ -ИФН ИФА (табл.4).

Таблица 4.

Суммарные результаты диагностических исследований на туберкулез крупного рогатого скота в хозяйстве №2.

Результат симультанной пробы	Всего животных со знаком +, -, =	Результат γ -ИФН ИФА, количество животных		
		Положительных	Отрицательных	(реагирующих на ППД-туб. для птиц)
+	15	6	9	(1)
-	29	9	20	(1)
=	11	3	8	(1)
Итого	55	18	37	(3)

Анализ материалов, представленных в таблице 4, позволил заключить следующее. При учете реакции проб крови от всех 5 нереагирующих на туберкулин животных в γ -ИФН ИФА были получены отрицательные результаты (показатели ОП 450 В-А в пределах 0,007-0,057). Совпадение результатов исследований двух диагностических тестов было установлено у 6 (40%) животных с положительными показаниями и у 20 (68,9%) животных с отрицательными показаниями. Из 11 животных с равной реакцией на ППД-туберкулин для млекопитающих и КАМ, 3 – дали положительную, 8 – отрицательную реакцию в γ -ИФН ИФА.

По результатам проведенных исследований в хозяйстве № 2 провели диагностический убой трех реагирующих коров, реагировавших в большей степени на ППД- туберкулин для млекопитающих и давших положительные показания в γ -ИФН ИФА. При патологоанатомическом осмотре у убитых ко-

ров не обнаружили характерных для туберкулеза изменений. Дальнейшие лабораторные исследования патматериала от убитых животных также дали отрицательный результат.

Полученные результаты исследований показывают, что в стадах с сильной степенью сенсибилизации животных атипичными микобактериями γ -ИФН ИФА также дает ложноположительные результаты. Тем не менее, отрицательно реагирующих животных по γ -ИФН ИФА гораздо больше (29 – по симуланной пробе, 37 – по γ -ИФН ИФА). Также следует отметить тот факт, что при применении γ -ИФН ИФА нет категории животных «с равной реакцией», то есть учитывая полученные результаты исследований есть основание предлагать γ -ИФН ИФА в качестве дополнительного диагностического теста для дифференциации неспецифических реакций на туберкулин при диагностике туберкулеза у крупного рогатого скота.

В хозяйстве № 3 при исследовании внутрикожной туберкулиновой пробой 739 голов крупного рогатого скота было выявлено 24 реагирующих на туберкулин животных с увеличением толщины кожной складки на 3-6 мм. От всех 24 реагирующих коров и 11 не реагирующих на туберкулин были отобраны пробы крови и исследованы методом γ -ИФН ИФА (табл.5).

Таблица 5.

Суммарные результаты диагностических исследований на туберкулез крупного рогатого скота в хозяйстве №3.

Результат ВТП	Количество животных	Результат γ -ИФН ИФА, количество животных	
		Положительных	Отрицательных (реагирующих на ППД - туб. для птиц)
Положительный	24	0	24 (2)
Отрицательный	11	0	11 (0)

Данные таблицы 5 свидетельствуют о том, что все 11 ВТП-негативных животных были также отрицательными и в γ -ИФН ИФА (показатели ОП 450 В-А: -0,053 - 0,046). 24 реагировавшие на туберкулин коровы дали отрицательные результаты в γ -ИФН ИФА (ОП 450 В-А от 0,022 до 0,076). Две из них реагировали на ППД- туберкулин для птиц (-0,11 и -0,896 соответственно).

По результатам исследований провели диагностический убой пяти реагировавших на туберкулин и не реагировавших в γ -ИФН ИФА коров. Животные были подвергнуты патологоанатомическому исследованию и от каждой были взяты пробы патматериала.

При патологоанатомическом осмотре убитых коров характерных для туберкулеза изменений не обнаружили. При лабораторном исследовании

патматериала от убитых животных возбудителя туберкулеза не выделили. Выделили нефотохромогенные атипичные микобактерии III группы по классификации Раньёна.

Полученные комплексные результаты сравнительных исследований двух прижизненных диагностических методов позволяют сделать вывод о том, что использование метода γ -ИФН ИФА в хозяйстве №3, так же как и в хозяйстве №1, позволило исключить ложноположительные результаты ВТП при постановке комплексного диагноза на туберкулез.

2.4. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ ВНУТРИКОЖНОЙ ТУБЕРКУЛИНОВОЙ ПРОБЫ И γ -ИФН ИФА В НЕБЛАГОПОЛУЧНОМ ПО ТУБЕРКУЛЕЗУ ХОЗЯЙСТВЕ

В соответствии с Санитарными и Ветеринарными правилами от 1996 года, оздоровление неблагополучных по туберкулезу хозяйств проводят двумя методами: методом полной замены поголовья неблагополучного стада здоровыми животными и методом систематических диагностических исследований с выделением и убоем реагирующих больных туберкулезом животных.

В ветеринарной практике нашей страны наиболее часто применяется оздоровление методом систематических исследований и убоем реагирующих на туберкулин животных. При этом, всех животных, начиная с 2-х месячного возраста, исследуют внутрикожной туберкулиновой пробой через каждые 45-60 дней. Всех реагирующих на туберкулин животных считают больными и сдают на убой. Аллергические исследования и убой всех реагирующих животных проводят до получения по всему стаду двух подряд отрицательных результатов аллергических исследований.

Заключительный раздел нашей работы посвящен сравнительному изучению диагностической ценности внутрикожной туберкулиновой пробы и γ -ИФН ИФА при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота в неблагополучном по туберкулезу хозяйстве РФ.

Сравнительные эксперименты проводили с использованием проб крови крупного рогатого скота, полученных из неблагополучного по туберкулезу СПК «Уваровская нива» Тамбовской области (хозяйство №4).

В этом хозяйстве при исследовании 696 голов крупного рогатого скота было выявлено 16 реагирующих на туберкулин животных. Все реагирующие на туберкулин животные были убиты на мясокомбинате и подвергнуты патологоанатомическому исследованию. Пробы патматериала были взяты от каждого животного и исследованы в лаборатории. От всех убитых коров были отобраны пробы крови и исследованы методом γ -ИФН ИФА с применением отечественных и голландских ППД- туберкулинов для млекопитающих и ППД- туберкулинов для птиц.

Результаты сравнительных диагностических исследований животных с использованием γ -ИФН ИФА приведены в таблице 6.

Таблица 6.

Сравнительный анализ результатов ВТП и γ -ИФН ИФА полученных при исследовании крупного рогатого скота из хозяйства №4.

Результат ВТП	Количество животных	Результат γ -ИФН ИФА, количество животных		
		Положительных	Отрицательных	(реагирующих на ППД - туб. для птиц)
Положительный	16	13	3	(0)

Результаты исследований показали, что при исследовании 16 проб крови от реагирующих на туберкулин коров методом γ -ИФН ИФА, результаты были положительными в 13 случаях (совпадаемость результатов двух методов составила 81,2%). При этом показатели ОП 450 В-А у γ -ИФН-позитивных животных составляли от 0,167 до 2,342 после инкубации с различными антигенами. Пробы от трех коров дали отрицательную реакцию в γ -ИФН ИФА (показатели ОП 450 В-А составили от 0,078 до 0,031 соответственно). Следует отметить, что в γ -ИФН ИФА с ППД- туберкулином для птиц ни одно животное не дало положительной реакции.

Кроме того установлено, что при трехкратном исследовании каждой пробы крови наблюдалась 100% совпадаемость в интерпретации результатов γ -ИФН ИФА с использованием голландских и отечественных ППД- туберкулинов для млекопитающих и ППД- туберкулинов для птиц. Однако в ряде случаев при проведении однократных исследований, несмотря на статистически достоверную положительную корреляцию результатов ($r = 0,65$, $P < 0,05$) наблюдались цифровые расхождения показателей ОП 450 В-А, полученные с применением двух препаратов. При этом в большинстве случаев показатели ОП 450 А и ОП 450 В были значительно выше при использовании отечественных ППД- туберкулинов для млекопитающих и ППД- туберкулинов для птиц.

Для исключения или подтверждения диагноза на туберкулез, все убитые животные были подвергнуты патологоанатомическому исследованию, пробы патматериала исследовали культуральным и биологическим методами.

Анализ посмертных исследований позволил заключить следующее. При патологоанатомическом осмотре убитых коров характерные для туберкулеза изменения были обнаружены в 2-х случаях (обе были положительными в ВТП и γ -ИФН ИФА). При лабораторном исследовании патматериала от убитых животных туберкулез подтвержден еще у 5 реагировавших убитых коров (все пять были положительными в ВТП и γ -ИФН ИФА). При этом, при патологоанатомическом осмотре и лабораторном исследовании патматериала от 3-х реагировавших на внутрикожное введение туберкулина животных и не

давших положительный результат в γ -ИФН ИФА туберкулез не подтвержден ни в одном случае.

3. ВЫВОДЫ

1. Для прижизненной диагностики туберкулеза отработан метод «сэндвич»- ИФА, предназначенный для детекции γ -ИФН в пробах крови крупного рогатого скота. Установлено, что метод характеризуется высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью результатов.

2. Проведена сравнительная электрофоретическая оценка структурного состава голландских и отечественных ППД- туберкулинов для млекопитающих и ППД- туберкулинов для птиц. Показана возможность использования отечественного ППД- туберкулина для млекопитающих и ППД- туберкулина для птиц в коммерческом наборе «BOVIGAM™» для стимуляции T_H1 -клеток крови *in vitro* в дозе 50 мкл/мл.

3. Комплексными исследованиями с использованием внутрикожной туберкулиновой пробы и γ -ИФН ИФА изучена динамика формирования Т-клеточного иммунного ответа у экспериментально зараженных *M. bovis* телят. Определены сроки появления и максимального содержания γ -ИФН в крови опытных животных в процессе постинфекционного иммуногенеза. Установлена максимальная 100%-ная совпадаемость результатов ВТП и γ -ИФН ИФА на 135-е сутки после заражения. При этом у экспериментально зараженных телят диагностическое повышение уровня γ -ИФН в крови происходило на 20–50 суток раньше, чем внутрикожная реакция на ППД- туберкулин для млекопитающих.

4. Показано, что в благополучных по туберкулезу хозяйствах, где установлена сенсibilизация животных атипичными микобактериями, γ -ИФН ИФА дает в 3 раза меньше ложноположительных результатов по сравнению с внутрикожной туберкулиновой пробой. При этом установлена 100%-я совпадаемость результатов полученных с помощью ВТП и γ -ИФН ИФА при исследовании здоровых животных.

5. Установлено, что в неблагополучном по туберкулезу хозяйстве, при исследовании инфицированных туберкулезом коров, результаты исследований с применением внутрикожной туберкулиновой пробы и γ -ИФН ИФА совпали в 81,2% случаях.

6. Полученные результаты экспериментальных исследований свидетельствуют об эффективности γ -ИФН ИФА в качестве прижизненного (наряду с ВТП) метода иммунодиагностики туберкулеза крупного рогатого скота. Установлено, что эффективность вышеуказанных методов, основан-

ных на реакциях клеточного иммунитета, существенно возрастает при их совместном применении.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

γ -ИФН ИФА целесообразно использовать как дополнительный метод прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в целях дифференциации аллергических реакций на туберкулин в благополучных по туберкулезу хозяйствах Российской Федерации. Исследования с помощью метода γ -ИФН ИФА рекомендуется проводить через 7-30 суток после проведения плановой туберкулинизации.

5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. О.А.Верховский, А.Х.Найманов, О.А.Савицкая, Ю.Н.Федоров, Н.П.Овдиенко. Использование метода «сэндвич»-ИФА для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота // Сборник научных трудов ВНИИБТЖ, Омск, 2001, с.173-175.

2. O.A.Verkhovsky, A.Kh.Naymanov, O.A.Savitskaya, Yu.N.Fedorov, N.P.Ovdienko and J.D.Collins. Evaluation of the single intradermal tuberculin test and the commercial γ -interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infected cattle in Russia // Abstr. of the 6th International Veterinary Immunology Symposium, Sweden, Uppsala, 2001, p.174.

3. А.Х.Найманов, О.А.Верховский, О.А.Савицкая. γ -ИФН ИФА при туберкулезе крупного рогатого скота // Ж. Ветеринарная патология, 2004, №1-2 (9), с.118-121.

4. О.А.Верховский, А.Х.Найманов, О.А.Савицкая. Динамика содержания γ -интерферона в крови крупного рогатого скота при туберкулезе // Ж. Ветеринарная патология, 2004, №1-2 (9), с.121-123.

5. А.Х.Найманов, О.А.Верховский, О.А.Савицкая, Н.П.Овдиенко, Ю.Н.Федоров. Определение γ -интерферона для диагностики туберкулеза // Ж. Ветеринария, 2004, №6, с.19-22.

Принято к исполнению 24/05/2004
Исполнено 25/05/2004

Заказ № 228
Тираж 100 экз

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93
(095) 747-64-70
(095) 318-40-68
www.autoreferat.ru

РНБ Русский фонд

2007-4

4786