

ЛАТЫПОВ ФАРИД РАУФОВИЧ

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ТУБЕРКУЛИНОВЫХ РЕАКЦИЙ
У КРУПНОРОГОВОГО РОГАТОГО СКОТА**

16 00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология



АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук



003 176464

Работа выполнена на кафедре эпизоотологии ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана»

Научный руководитель доктор ветеринарных наук, профессор
Сафин Марат Абдрахманович

Официальные оппоненты доктор ветеринарных наук, профессор
Алимов Азат Миргасимович
(Казанская государственная академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана)
доктор ветеринарных наук, доцент
Хамзин Рафат Асванович
(Главное управление ветеринарии
Кабинета Министров Республики Татарстан)

Ведущая организация ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных (г Казань)

Защита состоится «10» декабря 2007г в 14 ч на заседании диссертационного совета Д-220 034 01 при ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана» по адресу 420074, г Казань, ул Сибирский тракт, д 35, ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана»

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана»

Автореферат разослан «7» ноября 2007 г

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор ветеринарных наук, профессор



М С Ежкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одной из ближайших и важнейших задач ветеринарной науки и практики является полное оздоровление крупного рогатого скота от туберкулеза, который наносит огромный экономический ущерб народному хозяйству и представляет серьезную опасность для здоровья людей. Туберкулез животных еще имеет значительное распространение в отдельных зонах страны, поэтому не исключена возможность заноса возбудителя инфекции и в хозяйства благополучных зон, что может привести вслед за этим и к ухудшению эпидемиологической ситуации по туберкулезу человека.

Применяемые в ветеринарной практике аллергический метод диагностики туберкулеза не во всех случаях обеспечивает точную постановку диагноза, особенно у больных животных, в состоянии анергии (А С Донченко, 1987, Ю А Макаров 1991 и др.) Поэтому своевременная постановка первичного диагноза и выяснение причин сенсibilизации макроорганизма к туберкулину во многом зависят от качества диагностических исследований и идентификации выделенных культур, без проведения которых эпизоотическая ситуация может оставаться неясной на протяжении ряда лет (Н П Овдиенко, 1986, А Х Найманов 1993, М А Бажин, 1995.)

Вместе с тем, не решен вопрос и дифференциации неспецифических реакций на туберкулин у крупного рогатого скота. Неспецифические реакции обуславливают огромные трудности в постановке диагноза на туберкулез и могут повлечь за собой необоснованное проведение противотуберкулезных мероприятий и неоправданный убой большого числа высокопродуктивных животных, свободных от туберкулеза.

Отсутствие достаточно надежных методов диагностики туберкулеза и дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота требуют совершенствования имеющихся и изыскания новых, более доступных прижизненных экспресс методов диагностики

Все вышеизложенные факты свидетельствуют об актуальности проведения исследований по усовершенствованию прижизненной диагностики туберкулеза и дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота

Цель и задачи исследования. Целью наших исследований являлось усовершенствование методов прижизненной диагностики туберкулеза и дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1 Изучить показатели повреждения нейтрофилов (тест - ППН) на лабораторных животных (морских свинках и кроликах), зараженных разными дозами микобактерией туберкулеза бычьего вида
- 2 Изучить тест – ППН на морских свинках, инфицированных атипичными микобактериями из штамма *M smegmatis*
- 3 Провести комплексные диагностические исследования крупного рогатого скота в хозяйствах с разной эпизоотической ситуацией по туберкулезу
- 4 Провести эпизоотический мониторинг в скотоводческих предприятиях РТ по туберкулезу и эхинококкозу за последних 5- 6 лет
- 5 Разработать рациональные методы диагностики туберкулеза и дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота
- 6 Определить экономическую эффективность применения разработанных методов диагностики и дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота

Научная новизна работы. Проведен биохимический анализ крови у морских свинок и кроликов, зараженных различными дозами микобактерией туберкулеза бычьего вида

Изучен тест – ППН на лабораторных животных (морских свинках, кроликах), экспериментально зараженных микобактериями туберкулеза

бычьего вида и на крупном рогатом скоте в хозяйствах с различной эпизоотической ситуацией по туберкулезу

Испытан тест - ППН на морских свинках до и после заражения атипичными микобактериями из штамма *M smegmatis*

Проведен мониторинг эпизоотической ситуации по туберкулезу и по эхинококкозу крупного рогатого скота в хозяйствах РТ.

Впервые испытан очищенный и разбавленный эхинококковый аллерген, для дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота с помощью модифицированного метода Кацони.

Разработаны методические рекомендации «Показатели повреждения нейтрофилов (тест - ППН) для дифференциации неспецифических реакций на туберкулин у крупного рогатого скота»

Определена экономическая эффективность применения теста – ППН для дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота

Практическое значение. Полученные результаты исследований показывают, что с помощью теста – ППН представляется возможность своевременно дифференцировать неспецифические туберкулиновые реакции у крупного рогатого скота. Метод выполняем в условиях ветеринарной лаборатории. Использование предложенных методов дифференциальной диагностики туберкулеза позволят значительно повысить эффективность прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота и своевременно провести противотуберкулезные мероприятия.

Внедрение результатов исследований На основании полученных результатов исследований разработаны и внедрены методические рекомендации «Показатели повреждения нейтрофилов (тест – ППН) для дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота», утвержденные ГУВ КМ РТ 6 апреля 2007 года. По материалам исследований получено удостоверение на рационализаторское предложение № 444 от 30.06.03 г.

Теоретические и практические аспекты диссертации используются в учебной работе при чтении лекций, проведении лабораторно-практических занятий и научных исследований в ФГОУ ВПО КГАВМ

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- 1 Эпизоотическая ситуация по туберкулезу и эхинококкозу в скотоводческих предприятиях РТ
- 2 Модифицированная технология изготовления и применение нового аллергена из эхинококкового пузыря, а также эффективное его применение для дифференциации неспецифических реакций на туберкулин, обусловленных эхинококкозом
- 3 Эффективность теста – ППН на лабораторных животных и крупном рогатом скоте для прижизненной и дифференциальной диагностики туберкулеза
- 4 Возможность применения теста – ППН и ПЦР для дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота в хозяйствах с различной эпизоотической обстановкой

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на конференции молодых ученых и специалистов Казанской государственной академии ветеринарной медицины им Н Э Баумана (Казань, 2004), на международном симпозиуме по теме «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний» (ФГУ Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных (Казань 2005), на Всероссийской научно - практической конференции молодых ученых, посвященной 450 - летию вхождения Удмуртии в состав России «Молодые ученые в реализации национальных проектов» (Ижевск 2006), на ассоциации практикующих ветеринарных врачей Татарстана «Ветеринарная медицина домашних животных» (Казань, КГАВМ 2006), опубликованы статьи в Ученых записках КГАВМ им НЭ Баумана (Казань 2006), в материалах «Всероссийской научно - производственной конференции» (Казань 2007)

Пути реализации Результаты исследований, рекомендации целесообразно использовать при разработке научно – обоснованных систем эпизоотического надзора и контроля при туберкулезе крупного рогатого скота в различных регионах РФ, особенно в хозяйствах, где выделяются животные с неспецифической реакцией на туберкулин

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе методические рекомендации, утвержденные ГУВ КМ РТ 6 апреля 2007 г

Объем и структура диссертации Диссертация изложена на 153 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов, списка литературы, включающего 195 источника, (из них 42 иностранных авторов) Диссертация иллюстрирована 14 таблицами, 15 фотографиями

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

Работа выполнена в период с 2003 – 2007 годах на кафедре эпизоотологии ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана» Проводили исследования также совместно с сотрудниками республиканский ветеринарной лаборатории по изучении биоматериалов, привезенных из различных хозяйств Республики Татарстан

Кровь для гематологических и биохимических исследований брали у морских свинок и кроликов из краевой ушной вены, у крупного рогатого скота из яремной вены, соблюдая правила асептики

Для изучения гематологических и биохимических показателей крови и постановки теста ППН до и после заражения животных микобактериями туберкулеза проводили опыты на 16 морских свинках и 12 кроликах Морских свинок разделили на 4 группы, по 4 животного в каждой Первую группу

морских свинок заражали культурой микобактерии туберкулеза бычьего вида в дозе 0,10 мг на 1 голову, вторую группу животных инфицировали этой же культурой в дозе 0,15 мг, а третью группу животных заражали бактериальной массой в дозе 0,20 мг на голову. Всем опытным животным, культуру микобактерии туберкулеза бычьего вида, вводили в физиологическом растворе, подкожно в область паха Четвертая группа животных из 4-х морских свинок служила контролем

Кровь у морских свинок для постановки теста - ППН брали через 15 и 30 дней после заражения микобактериями туберкулеза из краевой ушной вены в стерильные мини пробирки с добавлением антикоагулянта Затем в лунки стерильного планшета добавляли по 40 мкл цитрированной крови и в эти же лунки приливали соответствующие аллергены (из расчета 4 1).

Кроликов (12 голов) разделили также на 4 группы по 3 животного в каждом Первую группу кроликов, заражали культурой микобактерии туберкулеза бычьего вида в дозе 0,55 мг, вторую группу по 0,60 мг и третью группу по 0,65 мг микробной массы на голову Всем кроликам опытных групп вводили культуру *M bovis* в 1,5 мл физиологическом растворе подкожно в область паха. Четвертая группа животных из трех кроликов служила контролем Для постановки теста - ППН брали кровь у всех кроликов до и через 15-30-60 суток после заражения микобактериями туберкулеза из краевой ушной вены в стерильные минипробирки с добавлением 5%-ного цитрата натрия из расчета 9 1

Для изучения специфичности аллергического состояния организма у морских свинок, зараженных атипичными микобактериями из штамма *M smegmatis* в тесте ППН был проведен опыт на 12 морских свинках, весом 300-320 грамм Их также разделили на 3 группы по 4 животного, из которых образовали три опытных, и одну группу контроля Опытных животных заражали культурой атипичных микобактерий из штамма *M smegmatis*, Культуру атипичных микобактерии вводили животным подкожно в область паха в 0,5 мл физиологического раствора из расчета по 0,10 мг в первой группе,

0,15 мг во второй и по 0,20 мг в третьей группу Четвертая группа животных служила контролем.

Гематологические исследования проводили общепринятыми методами (А А Кудрявцев и др, 1969, В В Меньшиков, 1987) Подсчет количества эритроцитов и лейкоцитов производили в камере Гаряева, а содержание гемоглобина определяли гемометром Сали (Л П Жаворонков, В М Зяблицкий, 1980)

Биохимические исследования сывороток крови у животных проводили с помощью аппарата ФП-901 в режиме полуавтомат с использованием реактива «Эколап» (производство Россия)

Динамику аллергического статуса организма изучали на ранних стадиях туберкулеза на лабораторных животных (морских свинках, кроликах) и на крупном рогатом скоте путем подсчета повреждения нейтрофилов (ПН) в присутствии специфического аллергена *in vitro* по методу В А. Фрадкина, 1985 год Животных для опытов подбирали по принципу аналогов, с учетом пола, породы, возраста и живой массы

Убой морских свинок производили через 30 суток, а кроликов спустя 60 суток после заражения Туши и внутренние органы лабораторных животных подвергали тщательному патологоанатомическому осмотру, а биоматериал от них исследовали общепринятыми лабораторными методами (бактериоскопической, бактериологической, гистологической и биопробой на морских свинках) Для лабораторных исследований использовали паренхиматозные органы (кусочки печени, легких, почек, селезенки) и лимфатические узлы (предлопаточные, средостенные, бронхиальные, заглочные, брыжеечные и паховые)

Для уточнения диагноза на туберкулез у морских свинок и кроликов, а также для постановки прижизненного диагноза и дифференциальной диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота проводили ПЦР (полимеразную цепную реакцию) в отделе молекулярной генетических исследований ФГУ ВПО ФТЦРБ совместно с профессором Т Х Фаизовым

В качестве материала для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) от коров, реагирующих на внутрикожное введение туберкулина, брали молоко и кровь, а при контрольном убое животных брали и лимфатические узлы (заглочные, предлопаточные, средостенные, бронхиальные, брыжеечные). ПЦР проводили с праймером, входящими в состав набора тест – систем, «Амплиценс» (ЦНИИ эпидемиология) для диагностики *Mycobacterium tuberculosis, bovis*, которые амплифицируют фрагмент ДНК с размером 357 пар нуклеотидов, определяемый фрагмент последовательности гена МПБ 64 *Mycobacterium tuberculosis, bovis* Амплифицированную ДНК разделяли методом горизонтального электрофореза в 2% - ном агарозном геле

Патоморфологические исследования проводили по методике описанной А И Яковлевой (Г Н Першин, 1971)

Аллергические исследования морских свинок, кроликов, а также бактериоскопические и бактериологические исследования патологического материала от зараженных животных проводили в соответствии с «Рекомендациями по лабораторной диагностике туберкулеза» Всесоюзного научно-исследовательского института бруцеллеза и туберкулеза животных (1988).

Для выяснения эпизоотической ситуации по туберкулезу и эхинококкозу крупного рогатого скота в республике Татарстан нами были изучены и обобщены результаты отчетов ГУВ КМ РТ и 10 мясокомбинатов республики за 2001 – 2006 годы, с ежегодным охватом 43 районов, в том числе более тысячи ферм крупного рогатого скота

Изучение эпизоотической ситуации по эхинококкозу в РТ, а также изготовление и испытание аллергена из эхинококкового пузыря были проведены совместно с доцентом кафедры паразитологии ФГОУ ВПО КГАВМ им Баумана Д Г Латыповым

Для постановки теста – ППН, ПЦР от коров в неблагополучном по туберкулезу хозяйстве «ОАО Клементейкино» Альметьевского района РТ брали кровь и молоко, кусочки лимфатических узлов и паренхиматозные

органы для лабораторных исследований Аналогичные исследования проводили и в 14 благополучных хозяйствах республики (КП им Горбунова, им Рахимова, « Апас » Апастовского района, Учхоз КГАВМ, «Битаман», «Айбаш», Высокогорского района, им Вахитова, «Кургузи», им Ленина, «Овощевод», «Колос-Синтез», «Маевка», «Уразла», «Ключи» Зеленодольского района)

Статистическую обработку цифровых данных проводили по разработанным программам в Microsoft Excel Достоверность устанавливали по методу Стьюдента - Фишера (И А Плохинский, 1970)

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Показатели повреждения нейтрофилов (тест - ППН) у морских свинок, зараженных микобактериями туберкулеза бычьего вида

В качестве специфического аллергена использовали очищенный ППД туберкулин для млекопитающих Для контроля специфичности аллергического состояния организма путем повреждения лейкоцитов крови (нейтрофилов), применяли также разные гетерогенные аллергены бруцеллезный антиген для РА, РСК, РДСК, паратуберкулезный антиген для РСК, эхинококковый аллерген, а также стерильный физиологический раствор

ППН у всех морских свинок до заражения микобактериями туберкулеза колебался в пределах от $2,6 \pm 0,7\%$ до $5,7 \pm 0,7\%$ Через 15 суток после заражения результаты ППН при инкубировании крови с ППД туберкулином составили в первой группе морских свинок $42,2 \pm 1,2\%$, во второй - $38,4 \pm 1,0\%$, а в третьей группе - $50,7 \pm 1,4\%$

При инкубации бруцеллезным, паратуберкулезными антигенами, эхинококковым аллергенами и физиологическим раствором показатели повреждения нейтрофилов не превышали $4,5 \pm 0,5\%$

Через 30 суток после заражения процент поврежденных нейтрофилов с ППД туберкулином составил в первой группе - $63,6 \pm 1,3\%$, во второй -

67,2±0,2%, в третьей группе животных 69,8±1,2%. При инкубации с гетерогенными аллергенами показатели теста - ППН также не превышали 5%

В результате проведенных исследований установили, что у зараженных туберкулезом животных наиболее значительные изменения повреждения нейтрофилов отмечаются при инкубации с ППД туберкулином. При этом процент поврежденных нейтрофилов в нашем опыте колебался через 15 дней после заражения от 38,4±1,0% до 50,7±1,4%, а через 30 дней от 63,6±1,3% до 69,8±1,2%

Специфичность аллергического состояния организма у морских свинок, зараженных микобактериями туберкулеза, определяли инкубированием крови с бруцеллезным, паратуберкулезным антигенами, эхинококковым аллергеном, а также стерильным физиологическим раствором. С гетерогенными аллергенами показатели повреждения нейтрофилов теста - ППН у зараженных животных было в пределах - от 2,1±0,3% до 5,1 ±0,5%

Показатели повреждения нейтрофилов у морских свинок, зараженных атипичными микобактериями из штамма *M. smegmatis*

Для постановки теста - ППН кровь у морских свинок брали через 15 и 30 дней после заражения по вышеуказанной методике

Во всех трех группах у морских свинок показатели повреждения нейтрофилов до заражения колебались в пределах от 2,1±0,1% до 5,4±0,6%

Спустя 15 суток после заражения в первой опытной группе морских свинок показатели теста - ППН при инкубации с ППД туберкулином в среднем составили 4,2±1,2%, во второй опытной группе 2,8±0,6% а в третьей контрольной группе 2,5±0,3%. Показатели повреждения нейтрофилов при инкубировании крови бруцеллезным, паратуберкулезным антигенами, эхинококковым аллергеном, а также при контроле с физиологическим раствором варьировали от 2,7±0,1% до 5,1±0,1%

Процент поврежденных нейтрофилов у зараженных атипичными микобактериями животных при инкубировании с ППД туберкулином спустя 30 суток составил в первой группе - $4,4 \pm 0,1\%$, во второй - $5,7 \pm 0,3\%$, в третьей контрольной группе - $3,2 \pm 0,7\%$. В свою очередь с другими гетерогенными аллергенами показатели теста - ППН колебались от $1,6 \pm 0,2\%$ до $5,5 \pm 0,3\%$.

Проведенные исследования показали, что морские свинки зараженные атипичными микобактериями из штамма *M. smegmatis* показывают отрицательные результаты теста - ППН, при этом процент поврежденных нейтрофилов, как со специфичным, так и с гетерогенными аллергенами, а также физиологическим раствором колеблется в пределах от $1,7 \pm 0,5\%$ до $4,7 \pm 0,9\%$.

Патоморфологические изменения в органах и тканях морских свинок, инфицированных атипичными микобактериями из штамма *M. smegmatis*

Легкие у морских свинок были не спавшиеся, бледно красного цвета, наполнены воздухом. Легочная ткань не была изменена, обнаруживали фокусы дистеликтаза и ателектазы с утолщением межальвеолярных перегородок. В местах утолщения отмечается инфильтрация – гистеоцитарных клеток, а также расширение и кровенаполнение капилляров. Макроскопически лимфатические узлы в объеме не увеличены, округлой формы и эластичны.

Проведенные исследования показали, что при инфицировании животных атипичным штаммом микобактерий (*M. smegmatis*) образование специфичных эпителиоидно - клеточных гранулем, характерных для туберкулеза, не происходит.

Показатели повреждения нейтрофилов (ППН - тест) у кроликов, зараженных микобактериями туберкулеза бычьего вида

До заражения у всех опытных и контрольных групп животных, как со специфичным, так и с гетерогенными аллергенами показатели теста - ППН не превышали 5 %.

Спустя 15 суток после заражения кроликов из опытных групп показатели повреждения полиморфно - ядерных лейкоцитов (нейтрофилов) при инкубировании со специфическим аллергеном (ППД туберкулином) составили в первой группе $39,6 \pm 2,8\%$, во второй - $41,2 \pm 2,0\%$, а в третьей $46,7 \pm 1,7\%$. При инкубировании крови с бруцеллезным, паратуберкулезными антигенами, и с эхинококковым аллергеном, а также с физиологическим раствором показатели повреждения нейтрофилов не превышали 5%

Через 30 суток после заражения в тесте – ППН процент повреждения нейтрофилов с ППД туберкулином составил в среднем первой группе $52,7 \pm 2,0\%$, во второй - $60,2 \pm 1,9\%$, в третьей - $59,4 \pm 1,7\%$, а в контрольной группе данный показатель не превышал $4,4 \pm 0,4\%$. При инкубации с другими аллергенами максимальный процент повреждения нейтрофилов был $5,2 \pm 0,5\%$

Спустя 60 дней после заражения при инкубации с ППД туберкулином процент повреждения нейтрофилов увеличился в первой группе он вырос до $61,8 \pm 2,4\%$, во второй - $63,3 \pm 2,0\%$, в третьей - до $69,1 \pm 2,6\%$. Показатель повреждения нейтрофилов с гетерогенными аллергенами не превышал $5,3\% \pm 0,4\%$, что свидетельствует о специфичности теста ППН с туберкулином

Высокий процент повреждения нейтрофилов при инкубации крови с ППД туберкулином отмечается у животных, зараженных микобактериями туберкулеза. Тогда как у контрольных животных, исследованных в эти же сроки, показатель повреждения нейтрофилов не превышал 5%

У опытных и контрольных животных при инкубации крови с бруцеллезным, паратуберкулезными антигенами, а также с эхинококковым аллергеном, при проведении теста - ППН процент повреждения нейтрофилов варьировал от 1 до 5 процентов, что свидетельствует о специфичности теста – ППН

Патоморфологические изменения в органах кроликов зараженных *M. bovis*

При патологоанатомическом вскрытии трупов кроликов, зараженных *M. bovis*, через 60 суток после заражения, отмечали выраженные туберкулезные очаги в области легких, увеличенные в размере. На поверхности разреза ткани легкого видна желтоватая масса плотной консистенции.

У кроликов из контрольной группы в легких характерные для туберкулеза изменения не были обнаружены.

Регионарные к месту заражения (левые паховые лимфатические узлы) были плотной консистенции, приводящие в следствие к увеличению органа в несколько раз. При разрезе лимфатических узлов выделялась зловонная масса творожистой консистенции желтовато - серого цвета.

Результаты комплексных исследований крупного рогатого скота в благополучных по туберкулезу хозяйствах

Нами были проведены исследования 95 голов крупного рогатого скота по изучению этиологии аллергических реакций на туберкулин в 14 благополучных по туберкулезу населенных пунктах 3-х районов республики. Во многих ранее благополучных хозяйствах появляется крупный рогатый скот, реагирующий на туберкулин, а при убое этих животных при лабораторных исследованиях туберкулез у них не подтверждался, поэтому эти реакции были отнесены к неспецифическим. Лабораторные исследования патологического материала проводили в бактериологическом отделе ветеринарной лаборатории РТ.

Проведенные исследования показали, что тест - ППН и ПЦР были отрицательными у всех исследованных животных.

При убое не реагирующих на тест - ППН животных и при патологоанатомическом исследовании их внутренних органов изменения характерные для туберкулеза, не были обнаружены. При посеве биоматериала

на искусственные питательные среды и при постановке биопробы на морских свинках, во всех случаях туберкулез был исключен. В результате комплексных исследований показатели аллергических реакций на ППД туберкулина у всех животных оценивались как неспецифические.

Полученные нами данные указывают, что у крупного рогатого скота, не инфицированного микобактериями туберкулеза, нейтрофилы крови при инкубации со специфичным аллергеном не повреждаются и поэтому показатели теста - ППН в этом случае могут служить прижизненным экспресс методом диагностики болезни и дифференциации неспецифических реакций на туберкулин.

Результаты комплексных исследований крупного рогатого скота в неблагополучном по туберкулезу хозяйстве

Исследования проводилось в неблагополучном по туберкулезу крупного рогатого скота ОАО «Климинтейкино» Альметьевского района РТ

Для изучения показателей повреждения нейтрофилов теста - ППН, использовали кровь, от всех 40 животных, реагировавших на ППД туберкулин. Кровь, взятая от 3-х коров, не реагирующих на туберкулин, служила контролем

• У 36 коров показатели теста - ППН варьировали от 21 до 59% поврежденных нейтрофилов. В контроле со стерильным физиологическим раствором показатели теста колебались в пределах от 1 до 4 %. У животных контрольной группы (Зголовы) результаты теста - ППН варьировали от 2 до 5% поврежденных нейтрофилов

Из 40 реагировавших на ППД туберкулин животных, положительный результат ПЦР нами был получен в 36 случаях по крови и в 28 случаях по молоку. При контрольном убое 26 животных из отобранного патологического материала были сделаны посевы на питательные среды. В посевах через 45 суток наблюдали обильный рост микобактерий туберкулеза. Результаты

биопробы также были положительными у всех животных, у которых была выделена культура микобактерии туберкулеза

Из анализа проведенных исследований видно, что из 40 голов крупного рогатого скота, реагирующих на ППД туберкулин, у 36 животных нами был установлен туберкулез. Вероятно, у 4-х животных аллергические реакции были неспецифическими, так как тест - ППН, а также ПЦР показывали отрицательные результаты

При контрольном убое 26 коров, реагирующих на ППД туберкулин, позитивные результаты теста - ППН совпали с положительными показателями ПЦР и результатами лабораторных исследований на туберкулез.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами было установлено, что тест - ППН при инкубировании крови с ППД туберкулином для млекопитающих может служить дополнительным прижизненным диагностическим тестом при туберкулезе крупного рогатого скота и результаты теста - ППН совпадают с показателями ПЦР.

Применение теста - ППН в ветеринарной практике позволяет также дифференцировать неспецифические реакции на введение ППД туберкулина и избежать неоправданного убоя высокопродуктивных и племенных животных

Изучение этиологии неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота

Реагировавших на туберкулин животных в 2006 году было зарегистрировано в 336 хозяйствах РТ. По количеству реагирующих животных это был самый высокий показатель по сравнению с остальными годами и составил 4832 головы, из которых 2928 были сданы на убой. Для лабораторных исследований на туберкулез было отобрано 1175 проб биоматериала.

Таким образом, за последние шесть лет из 1116 имеющихся в республике различных форм хозяйств в 346 (31%) выявлено реагирующих на внутрикожное введение туберкулина 24580 животных, или в среднем по 4146 голов ежегодно. Из

числа реагирующих на туберкулин 16219 животных (65,9%) было подвергнуто контрольно - диагностическому убою. От убитых 4635 животных (25%) пробы биоматериала подвергались лабораторным исследованиям на туберкулез. При этом в 120 случаях (2,5%) патологоанатомическим, бактериологическим методами и биопробой был выделен возбудитель туберкулеза.

Неоправданный убой животных с неспецифическими реакциями на туберкулин за один год в среднем равен количеству коров целого района республики.

Изучение туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота, пораженного гельминтами

По распространению ларвального эхинококкоза крупного рогатого скота республику можно разделить условно на три зоны. Это зоны слабой, умеренной и сильной инвазированности.

В слабо инвазированную зону входят 11 северных районов республики (Арский, Атнинский, Балтасинский, Кукморский, Мамадышский, Сабинский, Тюлячинский, Высокогорский, Агрызский, Елабужский и Менделеевский), один район Заволжья – Апастовский и один юго-восточный район - Бугульминский. В этой зоне инвазированность эхинококкозом крупного рогатого скота составляет от 0,1 до 3% от убойного поголовья в течение всего мониторинга.

В умеренно инвазированную зону республики входят пять Заволжских районов (Камско-Устинский, Зеленодольский, Кайбицкий, Верхнеуслонский и Дрожжановский), а также пять восточных районов (Актанышский, Менделеевский, Муслюмовский, Азнакаевский и Бавлинский), три центральных района (Лайшевский, Рыбно-Слободский и Нижнекамский) и один южный район (Спасский), где инвазированность эхинококкозом крупного рогатого скота колебалась от 3 до 10%.

Зона сильной инвазированности включает остальные 16 районов республики. Это 13 районов Закамья (Алькеевский, Алексеевский, Аксубаевский, Нурлатский, Чистопольский, Новошешминский, Черемшанский, Альметьевский, Заинский, Лениногорский, Сармановский, Тукаевский и Ютазинский), два района Заволжья (Бунинский и Тетюшский) и один центральный район Пестречинский. Результаты проведенных нами исследования показали, что в зонах слабой инвазированности эхинококкозом в таких районах как Арский, Атнинский, Сабинский, Менделеевский, Бугульминский неспецифических реакций на введение ППД туберкулина крупного рогатого скота за 2005 год не наблюдали.

В зонах сильной инвазированности, таких как Нурлатский район из 846 убитых коров 254 были инвазированы эхинококкозом, из которых 106 реагировали на ППД туберкулин. В Заинском районе из 842 убитых животных, 110 оказались инвазированы эхинококкозом. В этом районе в течение года были выявлены 1175 животных с неспецифическими реакциями на туберкулин.

Проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что неспецифические реакции на введения ППД туберкулина у крупного рогатого скота в зонах слабой инвазированности эхинококкозом почти не регистрируются.

Дифференциация неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота с помощью эхинококкового аллергена

Возможность и эффективность применения эхинококкового аллергена для дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота изучали в учебном хозяйстве КГАВМ, где также регистрировались неспецифические реакции на туберкулин у крупного рогатого скота. С этой целью через один месяц после туберкулинизации всем 345 животным ввели эхинококковый аллерген внутривенно в область средней

третьей шеи в дозе 0,2 мл. Учет и оценку реакции Кацони проводили через 1,5-3 часа и 24 часа после введения аллергена.

При исследовании 345 животных на туберкулез нами были выявлены 3 головы (0,9%), положительно реагирующих на туберкулин, в тоже время выявлены эхинококковым аллергеном в реакции Кацони 23 головы крупного рогатого скота. При этом у 4-х животных утолщение кожной складки (УКС) составило 8 мм, у 6-и – 9 мм, у 4-х – 10 мм, у 2-х – 13 мм, у 3-х – 16 мм и у 4-х – 18 мм.

Результаты положительно реагирующих на туберкулин 3-х коров, совпали с позитивными показаниями реакции Кацони. При патологоанатомическом исследовании лимфоузлов и внутренних органов от 3-х коров, реагировавших на ППД туберкулин, а также при микроскопии мазков, посева патологического материала на искусственные питательные среды и заражении морских свинок ни в одном случае микобактерий туберкулеза не было выявлено.

Эхинококковый аллерген (1 часть эхинококковой жидкости, 1,5 части физиологического раствора и 1,5 части глицерина) в реакции Кацони является специфичным и может быть использован для уточнения пораженности скота эхинококкозом. В благополучных по туберкулезу хозяйствах, где регистрируются поражение скота эхинококкозом, для дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций целесообразно использовать модифицированную аллергическую пробу Кацони.

ВЫВОДЫ

1. Применение теста - ППН позволяет правильно оценить эпизоотическую ситуацию по туберкулезу и дифференцировать неспецифические туберкулиновые реакции у крупного рогатого скота, — у морских свинок, кроликов и сельскохозяйственных животных, зараженных микобактериями туберкулеза бычьего вида, тест - ППН при

инкубировании крови со специфичным аллергеном (ППД туберкулином) дает положительный результат (процент поврежденных нейтрофилов от 20 до 69,8%),

- у здоровых животных этот показатель не превышает 5%,
- у животных, зараженных микобактериями туберкулеза бычьего вида, тест-ППН при инкубировании крови с бруцеллезным и паратуберкулезными антигенами, эхинококковым аллергеном, а также с физиологическим раствором дает отрицательный результат,
- у морских свинок, зараженных атипичными микобактериями штамма *M smegmatis*, тест - ППН при инкубировании крови со специфичным аллергеном и гетерогенными антигенами и аллергенами дает отрицательный результат

2 Тест - ППН дает 100%-ную корреляцию результатов исследования зараженного и здорового крупного рогатого скота с таковыми при молекулярно-генетических исследованиях (ПЦР) При этом тест-ППН не требует дорогостоящей аппаратуры и выполним в любой ветеринарной лаборатории

3 Наибольшее число неспецифических реакций у крупного рогатого скота, инвазированного гельминтами (фасциолами, дикроцелиумами, личинками эхинококков и другими) в РТ регистрируется при ларвальном эхинококкозе (50,6%)

4 Для дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций успешно может быть применена модифицированная реакция Кацони с эхинококковым аллергеном, приготовленным по модифицированной нами технологии

5 Экономическая эффективность на один рубль затрат при применении теста - ППН для дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций составляет 37,28 руб

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. По результатам исследований разработаны и внедрены методические рекомендации «Показатели повреждения нейтрофилов (тест - ППН) для дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота», утвержденные ГУВ КМ РТ от 6 апреля 2007 года

2 По материалам исследований получено удостоверение на рационализаторское предложение № 444 от 30.06.03 г., которое может быть использовано для выявления животных, пораженных ларвальным эхинококкозом, а также для дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота

3 Теоретические и практические аспекты диссертации используются в учебной работе при чтении лекций, проведении лабораторно-практических занятий и научных исследований в ФГОУ ВПО КГАВМ

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Латыпов, Ф.Р. Неспецифические туберкулиновые реакции у крупного рогатого скота / Ф.Р. Латыпов, Д.Г. Латыпов // Материалы конференции молодых ученых и специалистов Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана Казань, 2004 - С 35- 36

2 Латыпов, Ф.Р. Неспецифические позитивные реакции на туберкулин при эхинококкозе крупного рогатого скота / Ф.Р. Латыпов, Д.Г. Латыпов, А.М. Идрисов, М.Х. Лутфуллин // Часть 2 материалах международного симпозиума ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний Казань, 2005 - С 217- 220

3 Латыпов, Ф.Р. Показатели повреждения нейтрофилов (ППН) при экспериментальном туберкулезе морских свинок / Ф.Р. Латыпов, М.А. Сафин,

Д Г Латыпов // «Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 450 - летию вхождения Удмуртии в состав России» Молодые ученые в реализации национальных проектов 3 том - Ижевск, 2006 - С 61-64

4 Латыпов, Ф.Р Показатель повреждения нейтрофилов (ППН тест) у кроликов, зараженных микобактериями туберкулеза / Ф.Р. Латыпов // Сборник статей выпуск 3 ассоциации практикующих ветеринарных врачей Татарстана, Казанская государственная академия ветеринарной медицины Ветеринарная медицина домашних животных Казань, 2006 - С 65-68

5 Латыпов, Ф.Р Изучение теста ППН для диагностики и дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в неблагополучном по туберкулезу хозяйстве / Ф.Р Латыпов // Ученые записки КГАВМ им Н Э Баумана том 188 Казань, 2006 - С 145-150

6 Латыпов, Ф.Р Показатели повреждения нейтрофилов у морских свинок, зараженных атипичной штаммом микобактерии туберкулеза *M smegmatis* /Ф.Р Латыпов, М А Сафин, Д Г Латыпов // Материалы Всероссийской научно - практической конференции - Казань, 2007 - С 25-27

7 Латыпов Ф.Р Показатели повреждения нейтрофилов (тест - ППН) при экспериментальном туберкулезе на морских свинках /Ф.Р Латыпов, М А Сафин, Д Г Латыпов // «Материалы Всероссийской научно - практической конференции Казань, 2007 - С 27 – 29

Подписано к печати **23 10, 07**
Заказ **318** Тираж **100 экз**
Бумага офсетная

Формат 60x84/16
Усл - печ л **1,0**
Печать RISO