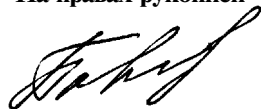


На правах рукописи



**ПАВЛОВ
ЮРИЙ НИКОЛАЕВИЧ**

**ДИАГНОСТИКА ЛАРВАЛЬНОГО ЭХИНОКОККОЗА
С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

03.00.19 - Паразитология

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

Тюмень 2005

Работа выполнена в институте ветеринарной медицины Федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Омский государственный аграрный университет»

Научный руководитель -

доктор ветеринарных наук,
профессор **ОКОЛЕЛОВ**
Владимир Иванович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор **МЕФОДЬЕВ**
Владимир Васильевич

кандидат биологических наук,
доцент **БЕЛЕЦКАЯ**
Наталья Ивановна

Ведущее учреждение:

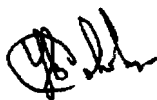
ГНУ Всероссийский научно-
исследовательский институт
гельминтологии
им. К.И. Скрыбина

Защита диссертации состоится «07» июля 2005 года в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д.006.009.01 при ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной энтомологии и арахнологии» по адресу: 625041, г. Тюмень, ул. Институтская, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной энтомологии и арахнологии по адресу: 625041, г. Тюмень, ул. Институтская, 2.

Автореферат разослан «06» июня 2005 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.б.н., профессор



Н.В. Солопов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Ларвальный эхинококкоз это одно из опаснейших паразитарных заболеваний животных и человека, наносящее значительный социально-экономический ущерб.

Медицинская служба не имеет возможности контроля за циркуляцией данного возбудителя в природе. Известно, что искоренение эхинококкоза у человека возможно только при условии ликвидации его у животных, поэтому борьба с этим зооантропонозом приобретает особую значимость.

Эхинококкоз регистрируется практически во всех странах, занимающихся разведением крупного рогатого скота, в том числе и в Российской Федерации (С.И. Исаков, 1982; А.И. Кротов, 1985; А.К. Журавец, 1999; С.А. Кенжебаев, 2000; А.С. Бессонов, 2003; P. Zlatibor, 1979; H. Worbes, 1992; H. Cohen et al., 1997).

В Омской области изучением гельминтологической ситуации по эхинококкозу занимались А.М. Петров (1941); И.Г. Клебанский (1947); А.Н. Каденацци, Г.Н. Герасимова (1958); А.И. Мирошникова (1964); Н.В. Кайгародова (1965); Ф.Н. Паутов (1969); В.А. Пахотина (1986). Ими установлена широкая распространенность эхинококкоза среди сельскохозяйственных животных, животноводов, и лиц связанных с переработкой животноводческого сырья.

Для ликвидации эхинококкоза необходимо проведение комплекса медико-ветеринарных мероприятий, в основе которых лежит изучение эпизоотологической ситуации и диагностика гельминтоза на обследуемой территории.

Рядом авторов (Р.С. Шульц, Р.Г. Исмаилова, 1962; Ш.А. Раззаков, 1975; Н.П. Лукашенко, 1975; Е.С. Лейкина, 1987; Ghedine, 1906; Fleig и Lisbonne, 1907; Garabedian, 1957; Fichman, 1960) для диагностики ларвального эхинококкоза у животных в производственных условиях были предложены следующие методы: реакция связывания комплемента, преципитации, не прямой гемагглютинации, сколексопреципитации, агглютинации с латексом, иммуноэлектрофореза, иммунофлуоресценции и иммуноферментного анализа.

На сегодняшний день в ветеринарной практике в ряде случаев применяются высокоточные методы исследований животных на эхинококкоз, такие как ультразвуковое сканирование, рентгеноскопия и рентгенография (А.С. Бессонов, 1997), внедрена полимеразная цепная реакция (ПЦР) (Э.А. Кузнецова, 2002). Широкое применение новых методов ограничено высокой их стоимостью, сложностью исполнения и невозможностью использования некоторых из них на крупных животных.

В настоящее время диагностика эхинококкоза животных традиционно основывается на проведении внутрикожной аллергической реакции Кациони в виду ее дешевизны и простоты применения.

По данным П.П. Вибе (1963), В.И. Захарова (1969), диагностическая эффективность реакции Кациони достигает 100 %. Другие исследователи (В.А. Бо-

ровский, И.С. Бикташев и др., 1969; В.Т. Рамазанов, 1969 и др.) наоборот отмечают, что эта реакция является неспецифичной и выявляет наличие в организме животных других гельминтов, а также микобактерий туберкулеза.

Поэтому существенную роль в решении данной проблемы может сыграть спектрофотометрия, как дополнительный метод исследований, предусматривающий применение современных приборов, которые совмещают простоту исполнения, возможность автоматизации и компьютерное обеспечение процесса исследований.

Известно, что при развитии таких болезней как малярия человека, лейкоз и туберкулез крупного рогатого скота, микобактериозы происходят изменения в составе крови. В.Г. Артюхов с соавторами (1980), Г.В. Максимов с соавторами (1989), В.И. Околелов и С.П. Божко (1998), В.И. Околелов, В.Г. Ощепков, К.В. Околелов (2003), Т.А. Пакусина (2004) отмечали качественное взаимодействие иммунных и ферментных комплексов с эритроцитами и наблюдали повреждение Q-связывательных способностей гемосодержащих белков.

Однако зависимость конформационных изменений в структуре гемоглобина при эхинококкозе в доступной нам литературе не описана.

Все вышесказанное определило актуальность темы и цель наших исследований.

Цель исследований. Разработка методологических подходов использования спектрофотометрии с компьютерным обеспечением для прижизненной диагностики ларвального эхинококкоза.

Задачи исследований:

- Изучить эпизоотологическую ситуацию по эхинококкозу крупного рогатого скота в районах Омской области;
- Сравнить специфичность традиционного и усовершенствованного аллергена для прижизненной диагностики эхинококкоза крупного рогатого скота;
- Получить диагностически значимые спектры гемолизата от лабораторных животных инвазированных ларвальным эхинококкозом и туберкулезом;
- Определить спектры гемолизата от естественно инвазированных эхинококкозом и здоровых коров;
- Дать сравнительную оценку спектрофотометрии как дополнительного метода дифференциальной диагностики ларвального эхинококкоза.

Научная новизна. Впервые разработаны методологические подходы к новому методу прижизненной диагностики ларвального эхинококкоза крупного рогатого скота с использованием спектрофотометрии. Проведён анализ эпизоотологической ситуации по эхинококкозу крупного рогатого скота в Омской области за 2000-2004 гг. Получен усовершенствованный эхинококковый аллерген для реакции Кацони и определена его специфичность. Выявлена положительная корреляция между коэффициентами поглощения световых

волн гемолизата кроликов, зараженных ларвальным эхинококкозом, а также у больных эхинококкозом и здоровых коров. Дана оценка спектрофотометрии, как дополнительного метода прижизненной дифференциальной диагностики ларвального эхинококкоза от туберкулёза крупного рогатого скота.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретически и экспериментально обоснована возможность применения спектрофотометрии для прижизненной дифференциальной диагностики ларвального эхинококкоза коров. Определены различия в коэффициентах поглощения световых волн гемолизата лабораторных животных зараженных эхинококкозом и туберкулезом, а также у больных эхинококкозом и здоровых коров.

Для практического использования изданы методические рекомендации по диагностике эхинококкоза крупного рогатого скота с помощью спектрофотометрии. Результаты исследований используются в учебном процессе на кафедре паразитологии и инвазионных болезней животных ИВМ ОмГАУ.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на: Международной научной конференции, посвященной 175-летию аграрной науки Сибири (Омск, 2003); Международной научно-производственной конференции, посвященной 100-летию Заслуженного деятеля науки РСФСР, доктора ветеринарных наук, профессора А.Н. Каденации (Омск, 2004); Международной научно-практической конференции посвященной 35-летию Сибирского отделения Российской академии сельскохозяйственных наук (Омск, 2004); IV-той Межрегиональной научно-практической конференции по проблемам ветеринарной медицины (Омск, 2005); на заседании сотрудников кафедры паразитологии и инвазионных болезней животных ИВМ ОмГАУ (Омск, 2005).

Публикации результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 105 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических предложений и приложения. Список использованной литературы включает 191 наименование, из них 48 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 8 таблицами и 11 рисунками.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Эпизоотологическая ситуация по эхинококкозу крупного рогатого скота в Омской области;
2. Экспериментальное обоснование разработанного метода диагностики эхинококкоза крупного рогатого скота;
3. Спектрофотометрия как дополнительный метод прижизненной дифференциальной диагностики ларвального эхинококкоза.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Тема диссертации является самостоятельным разделом плановой научно-исследовательской работы кафедры паразитологии и инвазионных болезней Института ветеринарной медицины Омского государственного аграрного университета «Изучение эпизоотологии и патогенеза ассоциативных паразитарных болезней животных Западной Сибири и разработка мер борьбы с ними», имеющей номер государственной регистрации 01.99.00.111.36.

Экспериментальная часть работы выполнялась в течение 2000-2004 гг. в лаборатории кафедры паразитологии и инвазионных болезней животных ИВМ ОмГАУ и в лаборатории ассоциированных с туберкулезом болезней крупного рогатого скота Всероссийского НИИ бруцеллёза и туберкулёза животных. Отдельные исследования проводились на мясокомбинатах и в хозяйствах Омской области.

Анализ эпизоотологической ситуации по эхинококкозу крупного рогатого скота в Омской области проводился по материалам ветеринарной отчетности мясокомбинатов и лабораторий ветеринарно-санитарной экспертизы рынков, а также по результатам проведения неполных гельминтологических вскрытий (НГВ) животных по методу К.И. Скрябина за 2000-2004 гг. Исследованию было подвергнуто 2136 голов крупного рогатого скота.

Экстенс- (ЭИ) и интенсинвазированность (ИИ) определяли по общепринятым в паразитологии методам. Оценку интенсивности инвазии проводили путем подсчета эхинококковых пузырей на одно инвазированное животное. Степень инвазированности определяли по следующей классификации: от 1 до 5 ларвоцист - слабая, 6-10 - средняя, 10 и более - высокая.

Динамику эхинококкоза крупного рогатого скота в районах области изучали по данным ежемесячного биомониторинга мясокомбинатов.

Для изучения ЭИ и ИИ собак эхинококкозом путем неполного гельминтологического вскрытия тонкого отдела кишечника (методом последовательного промывания) было обследовано 134 бродячих животных.

Для получения экспериментального эхинококкового аллергена на мясокомбинате «Омский» проводился отбор фертильных (плодоносных) ларвоцист *E. granulosus* от спонтанно инвазированного крупного рогатого скота. Цисты из печени животных с окружающей тканью промывали проточной водой (18-20°С) в течение 10 минут. Для предварительной стерилизации их помещали в 0,5 %-ный раствор перманганата калия и трехкратно промывали, затем наружную стенку цисты обрабатывали 1 %-ным спиртовым раствором йода. Соблюдая асептику, стерильным шприцем асперировали эхинококковую жидкость, после чего ее сливали в стерильную емкость с герметичной крышкой. Полученную нативную жидкость подвергали автоклавному при t=121°С и давлении 1 атм. в течение 30 мин. Далее для повышения активно-

сти эхинококкового антигена по разработанной нами методике жидкость подвергали облучению красным лазером (ЛГН-208А) при экспозиции 30 мин. Затем эхинококковую жидкость разливали в 20 мл флаконы, повторно автоклавировали при том же режиме и закатывали с помощью специальной машинки. Полученный аллерген хранили в холодильнике при $t=1-4^{\circ}\text{C}$.

Изучение специфичности нативной эхинококковой жидкости и экспериментального эхинококкового аллергена проводилось на трех опытных группах. Всего в опыте использовали 54 коровы.

Эхинококковый аллерген крупному рогатому скоту вводили внутрикожно, в области средней трети шеи в дозе 0,2 мл. Оценку результатов реакции Кациони проводили сопоставлением толщины кожной складки до и спустя 2 часа после введения препарата. Затем животных подвергали убою с последующей ветеринарно-санитарной экспертизой туш и внутренних органов.

Спектрофотометрические исследования проб крови от лабораторных животных и коров проводили на приборе «SPECORD M-400» производства Германии, оснащенном стандартными программами для вывода на печать, накопления информации на гибких дисках (около 500 спектров), индикации и вывода накопленной информации, циклического повторения измерений, статистической оценки, распечатки максимумов пиков, операциями над файлами.

Первоначально опыт провели на 15 кроликах массой 1,8-2 кг. Все животные предварительно были подвергнуты туберкулинизации ППД-туберкулином для млекопитающих и исследованы пробой Кациони.

После получения отрицательного результата аллергических реакций кроликов разделили на 3 группы по 5 животных в каждой.

Первую группу лабораторных животных заражали перорально яйцами *E. granulosus* в дозе 1000 ± 500 экземпляров.

Для получения яиц цестоды *E. granulosus* использовали трёх беспородных собак, которых заразили в дозе по 2000 ± 500 протосколексов, а спустя 75 дней после заражения, их подвергли эвтаназии. Полученные из просвета тонкого кишечника эхинококки, после 2-х недельного выдерживания их в холодильнике служили материалом для заражения.

Вторую группу заражали *M. bovis* (шт.8) в дозе 1 мл (500 тыс. м. т.) в краевую вену уха. Количество микробных тел для заражения оценивали по стандарту мутности вакцины БЦЖ.

Третья группа была интактной (контроль).

Контроль эффективности заражения кроликов эхинококкозом и туберкулезом проводили путем внутрикожного введения эхинококкового аллергена и ППД-туберкулина для млекопитающих.

Кровь для спектрофотометрии и гематологических исследований брали на 5, 15, 25 сутки после заражения с добавлением антикоагулянта (трилон-Б).

В процессе работы полученную кровь разливали в стеклянные флаконы с помощью дозатора фирмы «Labsystems OY» (Финляндия) с добавлением дистиллированной воды. Затем переливали в кварцевые кюветы и проводили спек-

трофотометрию гемолизата в диапазоне волн от 350 до 490 нм., при спектральном шаге 1,00 нм., скорости интегрирования 2,00 нм/с, со временем интегрирования 0,5 с, шириной поглощения монохроматора 2,0 нм.

При изучении гематологических показателей крови кроликов готовили мазки и окрашивали их по Паппенгейму. Количество лейкоцитов определяли в камере Горяева, а лейкоцитарную формулу - по трехпольному методу Филлипченко (Г.А. Симонян, 1999).

Достоверность полученных результатов исследований определяли по методу Стьюдента (И.А. Плохинский, 1970) с использованием программы BIOSTATISTICS v 4.03.

2.2. Эпизоотологическая ситуация по л а реальному эхинококкозу крупного рогатого скота в хозяйствах Омской области

По данным ветеринарной отчетности мясокомбинатов и лабораторий ветеринарно-санитарной экспертизы рынков, а также по результатам биомониторинга 5 мясокомбинатов за 2000-2004 гг. эхинококкоз крупного рогатого скота был выявлен во всех районах Омской области (рис. 1).

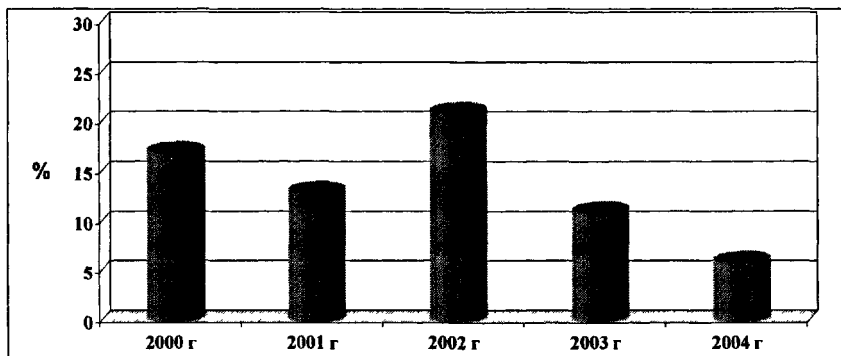


Рис. 1. Динамика экстенсивности коров ларвальным эхинококкозом в Омской области по данным мясокомбинатов

Анализируя статистические данные, полученные за пять лет, можно отметить тенденцию постепенного снижения уровня инвазированности крупного рогатого скота эхинококкозом. Так, например в 2000 году ЭИ крупного рогатого скота эхинококкозом составила 17 %. В 2001 году этот показатель уменьшился до 13 %, а в 2002 наблюдался резкий скачек заболеваемости до 21 %. В последующие годы происходило снижение заболеваемости, так в 2003 году ЭИ составляла 11 %, а в 2004 году - 6 % от убойного поголовья.

Результаты собственных исследований по изучению экстенс- и интенсинвазированности крупного рогатого скота ларвальным эхинококкозом свидетельству-

ют о широкой распространенности и в ряде случаев более высокой зараженности животных по сравнению с данными ветеринарных отчетов (табл. 1).

Таблица 1. Экстенс- и интенсинвазированность крупного рогатого скота ларвальным эхинококкозом по результатам НГВ за 2000-2004 гг.

| Годы | Кол-во исследованных животных | Кол-во больных эхинококкозом | ЭИ, % | ИИ, экз. |
|-------|-------------------------------|------------------------------|-------|-----------|
| 2000 | 205 | 36 | 17,6 | 6,28±0,56 |
| 2001 | 630 | 89 | 14 | 9,02±0,54 |
| 2002 | 520 | 182 | 35 | 7,07±0,22 |
| 2003 | 462 | 156 | 33,8 | 8,21±0,35 |
| 2004 | 319 | 42 | 13,2 | 7,33±0,40 |
| Итого | 2136 | 505 | 23,6 | 7,73±0,18 |

Согласно нашим исследованиям ларвальный эхинококкоз в Омской области имеет неодинаковое распространение. Это обусловлено зональностью обитания дефинитивных и промежуточных хозяев - собак и крупного рогатого скота, а также абиотическими факторами внешней среды.

По распространению ларвального эхинококкоза крупного рогатого скота территорию Омской области можно условно разделить на три зоны: это зоны слабой, умеренной и сильной экстенсинвазированности.

В слабо инвазированную зону вошли 5 северных районов области (Усть-Ишимский, Тевризский, Знаменский, Тарский, Седельниковский). В этой зоне инвазированность крупного рогатого скота составляла 0,4-3,0% от убойного поголовья.

Зона с умеренной инвазированностью включает 17 районов: Горьковский, Щербакульский, Больпеуковский, Большепереченский, Таврический, Муромцевский, Русско-Полянский, Павлоградский, Любинский, Кормиловский, Калачинский, Оконешниковский, Омский, Нижнеомский, Колосовский, Саргатский и Тюкалинский. В этой зоне ЭИ крупного рогатого скота в течение последних пяти лет колебалась от 3 до 10%.

В сильно инвазированную эхинококкозом зону вошли 10 районов: Искиткульский, Называевский, Крутинский, Москаленский, Марьяновский, Одесский, Нововаршавский, Черлакский, Азовский, Полтавский. По данным мясокомбинатов области в этой зоне ЭИ крупного рогатого скота эхинококкозом варьировала от 10 до 32%.

Изучая динамику зараженности животных ларвальным эхинококкозом, мы пришли к заключению, что данная инвазия регистрируется у коров в течение всего года с тремя пиками: наибольшее количество инвазированных животных выявляется в ноябре - декабре (13,4 - 15,5%), марте (18,2%) и июле (7,8%) (рис. 2).

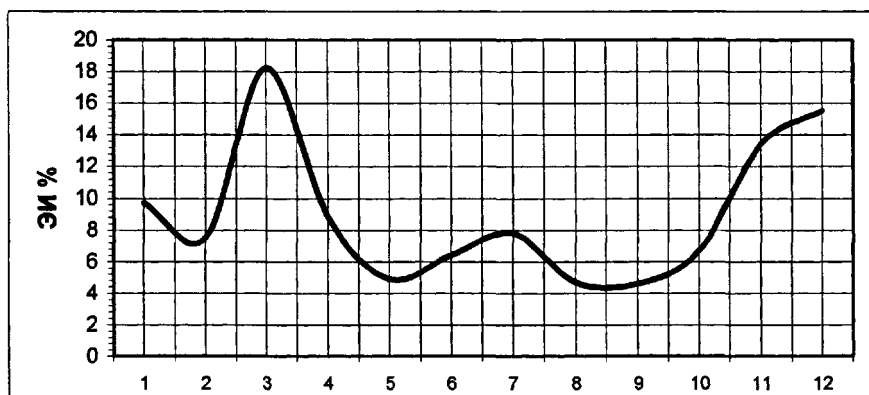


Рис 2. Динамика эхинококкоза крупного рогатого скота по данным биомониторинга Называевского и Исылкульского мясокомбинатов

Единичные фертильные цисты у крупного рогатого скота выявляли в осенне-зимний период с октября по февраль.

В весенне-летний период, в основном, регистрировали ларвоцисты без протоскопексов. Встречались также ларвоцисты размером с голубиное яйцо заполненные гноем, белой творожистой массой, иногда с признаками петрификации.

Наибольшая экстенсивность (14-35%) и интенсивность инвазии (7-8 экз.) наблюдается у дойных коров. Среди молодых животных (до двух лет) в основном встречаются единичные случаи заражения эхинококкозом (1-2%) со слабой интенсивностью инвазии (2-3 экз.), за период наблюдения плодоносные ларвоцисты у них не находили.

При изучении эпизоотологической ситуации по эхинококкозу среди бродячих собак была установлена высокая зараженность (табл. 2).

Таблица 2. Экстенсивность и интенсивность инвазии собак эхинококками

| Населенные пункты (н. п.) | Количество вскрытых кишечника | Количество зараженных | ЭИ, % | ИИ, экз. |
|---------------------------|-------------------------------|-----------------------|-------|----------|
| Каскат | 27 | 18 | 66,6 | 326±58 |
| Кромы | 28 | 13 | 46,4 | 305±73 |
| Комсомол | 23 | 9 | 39,1 | 343±86 |
| Лесной | 22 | 5 | 22,7 | 269±52 |
| Солнцево | 18 | 4 | 22,2 | 174±65 |
| Северное | 16 | 2 | 12,5 | 170±47 |
| Итого | 134 | 51 | 38 | 300±32 |

Наибольшая экстенсинвазированность животных отмечалась в трех населенных пунктах: Комсомол, Кромы и Каскат и составила 39,1-66,6 %; в меньшей степени были заражены собаки в н.п. Северное, Солнцево и Лесной - 12,5-22,7 %. Это связано с нарушением ветеринарно-санитарных правил по убою скота, принадлежащего частному сектору, а также отсутствием диагностических и лечебно-профилактических мероприятий по эхинококкозу собак.

2.3. Специфичность экспериментального эхинококкового аллергена в реакции Кацони

Специфичность эхинококкового аллергена изучали на 54 коровах. Перед убоем животных разделили на 3 группы: первая и вторая группы по 24 коровы; третья - 6 коров, реагирующих на туберкулин. Первой группе животных, вводили нативную пузырную жидкость, второй группе вводили экспериментальный эхинококковый аллерген. Третьей группе вводили нативную пузырную жидкость (3 гол) и экспериментальный эхинококковый аллерген (3 гол).

При использовании нативной пузырной жидкости утолщение кожной складки (УКС) у здоровых животных (11 гол) колебалось в пределах от 3 до 7 мм. У коров инвазированных эхинококками (9 гол) УКС достигло 10-26 мм. У животных при абсцессе печени (2 гол) и при плеврите (2 гол) УКС составило 3-6 мм.

При введении экспериментального эхинококкового аллергена нами было отмечено повышение специфичности реакции Кацони. При этом у здоровых животных (11 гол) УКС не превышал 2 мм. У коров инвазированных эхинококкозом (10 гол) УКС колебалось в пределах от 7 до 16 мм. У больных абсцессами печени (1 гол) и плевритами (2 гол) УКС не превышало 2 мм.

Однако, при введении нативной пузырной жидкости, а также экспериментального эхинококкового аллергена крупному рогатому скоту третьей группы, реагирующему на туберкулин, мы наблюдали проявление неспецифических реакций и утолщение кожной складки от 6 до 17 мм. На секции у животных обнаружены характерные для туберкулеза изменения в лимфатических узлах (заглочочных, подчелюстных и средостенных). Для постановки окончательного диагноза на туберкулез были отобраны кусочки внутренних органов и лимфатические узлы. Проведенные лабораторные исследования подтвердили наличие микобактерий туберкулеза.

Таким образом, исследования показали, что реакция Кацони с нативной эхинококковой жидкостью дает неспецифические показания у крупного рогатого скота при абсцессах печени, плевритах и при положительной реакции на туберкулин, а при использовании экспериментального эхинококкового аллергена только у положительно реагирующих на туберкулин животных.

В хозяйствах Исылкульского района провели выборочное аллергическое исследование 155 коров, из них 43 животных (27,7%) показали положительную реакцию на экспериментальный эхинококковый аллерген. Экстенсивность инвазии в хозяйствах составила: «Лесной» (1) - 23,6%, «Солнцево» (2)

- 23,3%, «Украинское» (3) - 30%, «Медвеженское» (4) - 35%.

Анализ результатов убоя крупного рогатого скота по данным мясокомбината показал аналогичную закономерность (Рис. 3).

Таким образом, используя реакцию Кацони с усовершенствованным эхинококковым аллергеном можно изучать и прогнозировать эпизоотическую ситуацию по ларвальному эхинококкозу крупного рогатого скота.



Примечание 1-4 – хозяйства

Рис. 3. Зараженность крупного рогатого скота ларвальным эхинококкозом в хозяйствах Исылькульского района по данным убоя и аллергического исследования

2.4. Методологические подходы к использованию спектрофотометрии для диагностики ларвального эхинококкоза

Ранее проведенные в лаборатории ассоциированных с туберкулезом болезней ВНИИБТЖ исследования по изучению спектров гемолизата от здоровых и больных туберкулезом коров с помощью спектрофотометрии (К.В. Околов, 2003) выявил разницу в спектрах поглощения, что позволило в дальнейшем экспериментально обосновать разработку нового метода диагностики туберкулеза крупного рогатого скота.

Исходя из этого, мы провели собственные изыскания по выбору диапазона волн для получения характерных спектров у зараженных эхинококкозом коров и лабораторных животных.

В результате мы установили, что наиболее информативной областью спектров поглощения является участок пика с длиной волны 415-420 нм, который по данным В.Г. Артюхова (1995) 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.

Проведенные опыты показали, что спектры гемолизата крови кроликов, зараженных эхинококкозом, имеют характерный пик в области 415 нм с коэффициентом поглощения на 5-е сутки после заражения 1850 у.е., на 15-е - 2150 и на 25-е соответственно 2200. У кроликов зараженных туберкулезом (*M. bovis* шт. 8) отмечали следующие коэффициенты поглощения: на 5-е сутки - 2560, на 15-е - 2980 и на 25-е - 2900. Коэффициент поглощения гемолизата от здоровых лабораторных животных (контроль) составил на протяжении всего периода 1760 ± 58 ($P < 0,05$) (рис.4).

Анализ полученных спектров гемолизата и морфологических показателей крови кроликов, зараженных ларвальным эхинококкозом и микобактериями туберкулеза, позволил выявить определенные закономерности, происходящие в организме лабораторных животных.

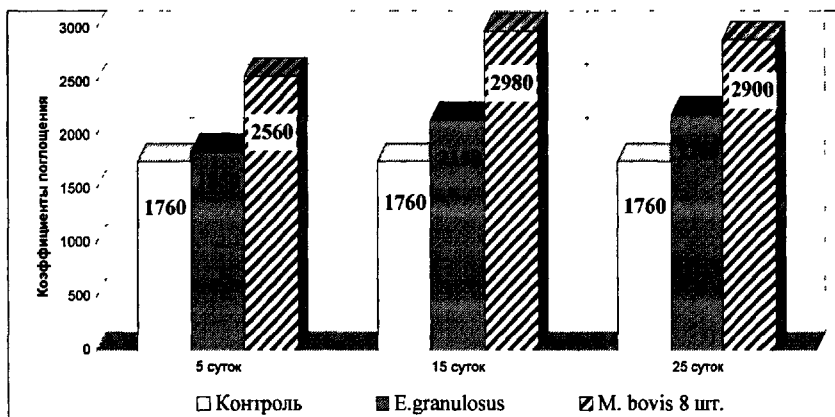


Рис. 4. Спектры гемолизата кроликов зараженных эхинококкозом, туберкулезом и в контроле на 5, 15 и 25 дни опыта

В спектрах гемолизата от кроликов, зараженных эхинококкозом, начиная с 5-х суток наблюдался постепенный рост коэффициентов поглощения по сравнению с контролем и к 25-му дню они достигали наибольших значений.

У кроликов, зараженных *M. bovis* шт. 8, коэффициенты спектров поглощения гемолизата существенно увеличились уже на 5-е сутки и к 15-му дню достигали наибольших значений.

В лейкограмме у зараженных эхинококкозом кроликов на 5-е сутки отмечалось увеличение количества эозинофилов в 2 раза.

У зараженных *M. bovis* кроликов на 5-е сутки отмечался существенный лейкоцитоз (14 тыс.), изменения происходили в лейкограмме: наблюдался лимфоцитоз и эозинофилия. Количество лимфоцитов в сравнении со здоровыми животными увеличилось в 1,3 раза, а эозинофилов - в 2 раза, число нейтрофилов снижалось: палочкоядерных в 3 раза, сегментоядерных в 6 раз,

что связано с мобилизацией защитных сил и сенсibilизацией организма, и как следствие, влияет на показатели спектрофотометрии гемолизата (рис.5).

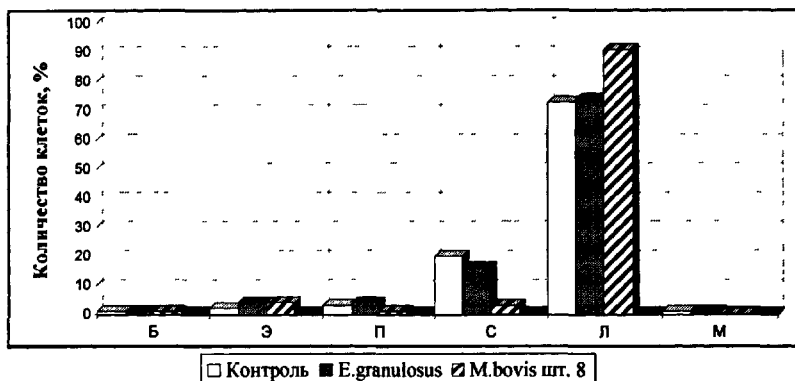


Рис. 5. Лейкоцитарный профиль кроликов через 5 суток после заражения

На 25-е сутки у зараженных животных сохранились высокие пики спектров по сравнению с контролем. В крови зараженных эхинококкозом кроликов содержание лейкоцитов в крови увеличилось (до 10 тыс.). Доля эозинофилов в сравнении с контролем возросла в 5 раз. Содержание сегментоядерных нейтрофилов уменьшилось в 2 раза, число лимфоцитов было выше нормы в 1,1 раза.

У кроликов зараженных *M. bovis* на 25-е сутки наблюдали лейкоцитоз (до 12 тыс.), снижение количества лимфоцитов и увеличение содержания сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов (рис.6).

Внутривенное заражение кроликов микобактериями бычьего вида вызвало развитие генерализованной инфекции с обширными поражениями легких, с последующей гибелью животных в течение 30-45 дней.

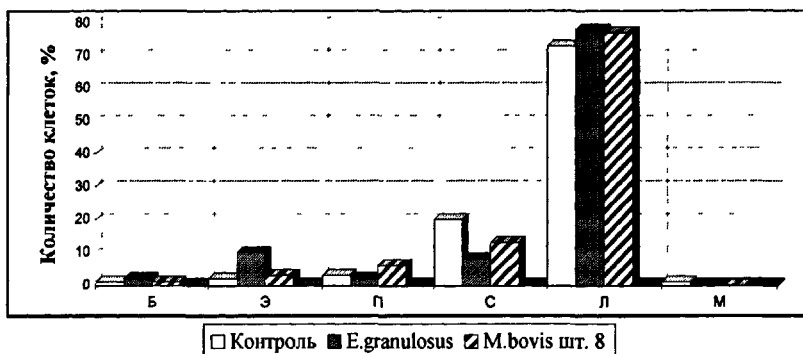


Рис. 6. Лейкоцитарный профиль кроликов через 25 суток после заражения

В группе контроля (интактной) у лабораторных животных показатели крови оставались в пределах физиологической нормы в течение всего периода эксперимента.

Анализ данных спектров поглощения гемолизата крови от кроликов, больных туберкулезом и ларвальным эхинококкозом, показал, что имеется характерный пик в области 415 нм, что соответствует комплексу белков гемоглобина крови, с коэффициентом поглощения при туберкулезе 2980 ± 58 и при ларвальным эхинококкозом 2220 ± 66 , контроль составил 1760 ± 67 .

2.5. Дифференциальная диагностика эхинококкоза от туберкулеза крупного рогатого скота

При изучении спектров гемолизата от коров больных эхинококкозом установлено, что в них имеется характерный пик в области 415 нм с коэффициентом поглощения 2100-2300, в контроле коэффициент поглощения составил 1600-2000 (рис.7). У животных отмечается лейкоцитоз, содержание эозинофилов увеличено в 2-3 раза по сравнению со здоровыми животными.

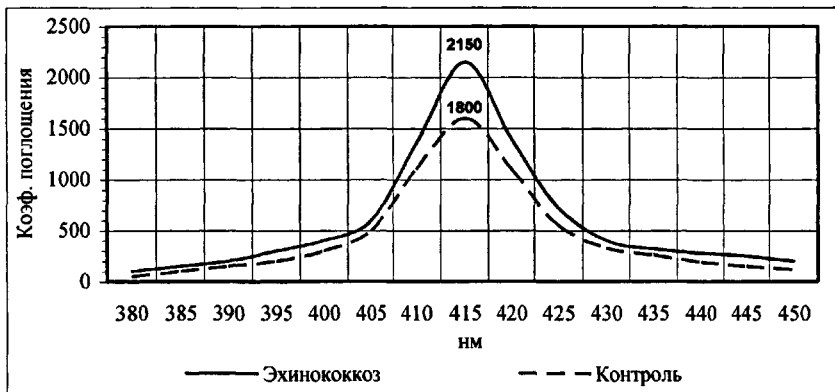


Рис. 7. Средние значения спектров поглощения гемолизата коров в норме и при ларвальном эхинококкозе

У здоровых животных коэффициенты поглощения составили $M-1800$, $m \pm 58$, а у больных коров, соответственно $M-2150$, $m \pm 39$ ($P < 0,05$).

Математическая обработка экспериментальных данных выявила достоверность различий.

При изучении спектров гемолизата крови от коров, больных ларвальным эхинококкозом и туберкулезом, установлено, что имеется характерный пик в области 415 нм, с коэффициентом поглощения при ларвальном эхинококкозе — 2150 ± 39 и при туберкулезе 3100 ± 51 , контроль составил 1800 ± 58 (рис. 8).



Рис. 8. Спектры поглощения гемолизата коров больных ларвальным эхинококкозом, туберкулёзом и контроль

Анализ полученных результатов позволяет считать, что по спектрам поглощения гемолизата, полученного от коров больных эхинококкозом и туберкулезом, можно проводить дифференциацию эхинококкоза от туберкулеза и в дальнейшем разработать дополнительный метод прижизненной дифференциальной диагностики эхинококкоза и туберкулеза крупного рогатого скота с использованием спектрофотометрии.

ВЫВОДЫ

1. Определены методологические подходы для разработки и внедрения в ветеринарную практику нового дополнительного метода прижизненной дифференциальной диагностики эхинококкоза крупного рогатого скота, основанного на спектрофотометрии гемолизата.

2. У крупного рогатого скота и кроликов после заражения эхинококкозом происходят конформационные изменения в гемоглобине, которые можно регистрировать с помощью спектрофотометрии в диапазоне длин волн от 350 до 500 нм и получать характерные спектры (коэффициенты поглощения), позволяющие отличать здоровых от зараженных животных.

3. Спектры гемолизата кроликов, зараженных эхинококкозом, отличаются тем, что максимальные пики поглощения регистрируется на 25-е сутки после заражения животных, при этом коэффициенты поглощения составляют 2000 - 2400 у.е., ($M=2200$, $m \pm 66$, $P < 0,05$). У кроликов, зараженных микобактериями туберкулеза максимальные пики спектров поглощения наблюдаются не 15-е сутки после заражения животных, при этом коэффициенты поглощения составляют 2800 - 3100 у.е. ($M=2980$, $m \pm 58$, $P < 0,05$).

4. В Омской области выявлены 3 условные зоны распространения эхинококкоза крупного рогатого скота: слабого инвазирования (экстенсивность

инвазии до 3%); умеренного инвазирования (ЭИ до 10%) и сильного инвазирования (ЭИ от 10 до 32%) со средней интенсивностью инвазии - $7,73 \pm 0,18$. Эхинококкоз регистрируется в течение всего года, однако, наибольшее количество зараженных животных выявили в ноябре - декабре (13,4% и 15,5%) и марте (18,2%). Плодоносные цисты регистрируются только у взрослых животных и в основном в осенне-зимний период, кроме этого экстенсивность инвазии дойного стада намного выше (24,5%), чем у молодняка (1%). Экстенсивность инвазии собак эхинококками по результатам неполного гельминтологического вскрытия составила 12,5 - 66,6 %, а интенсивность инвазии - 300 ± 32 .

5. Установлено, что неспецифические реакции у приготовленного экспериментального эхинококкового аллергена составили 3%, что на 24% меньше, чем у нативной пузырной жидкости (27%).

6. При спектрофотометрии гемолизата коров, больных эхинококкозом выявляется характерный пик в области длины волны 415 нм с коэффициентом поглощения 2100-2300 у.е. ($M-2150$, $t \pm 39$). При спектрофотометрии гемолизата коров, больных туберкулезом наблюдается пик с коэффициентом поглощения 2800-3600 у.е. ($M-3055$, $t \pm 91$). У здоровых коров коэффициенты поглощения гемолизата при этой же длине волны достигают лишь величин 1600-2000 у.е. ($M-1800$, $t \pm 58$ $P < 0,05$). У зараженных ларвальным эхинококкозом коров в крови наблюдается лейкоцитоз, в лейкограмме - отмечается выраженная эозинофилия. Количество эозинофилов увеличивается в 2-3 раза, что связано с мобилизацией защитных сил организма и развитием аллергии.

7. Доказана в эксперименте возможность применения спектрофотометрии для дифференциальной диагностики ларвального эхинококкоза от туберкулеза крупного рогатого скота за счет разницы коэффициентов поглощения света в гемолизате.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ:

Полученные в результате исследований данные, дают возможность оценить эпизоотологическую ситуацию Омской области по эхинококкозу крупного рогатого скота, установлены зоны с разной степенью экстенсивности инвазирования.

Для реакции Кацони создан усовершенствованный эхинококковый антиген, который можно использовать для оценки эпизоотического состояния по ларвальному эхинококкозу.

Разработаны методические рекомендации по диагностике эхинококкоза крупного рогатого скота с помощью спектрофотометрии, которые рассмотрены и одобрены НТС ИВМ ОмГАУ (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).

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Павлов Ю.Н., Околелов В.И. Влияние эхинококкоза на аллергические реакции туберкулиновой пробы // Эпизоотология, диагностика и профилактика хронических инфекционных болезней животных: Матер. Междунар. науч. конф., посвященной 175 - летию аграрной науки Сибири (Омск, 24 - 26 июня 2003 г.): Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. - Омск, 2003 - С. 153-159.

2. Павлов Ю.Н. Диагностика эхинококкоза крупного рогатого скота с помощью спектрофотометрии // Актуальные вопросы теоретической и практической паразитологии: Матер. Междунар. научно-производственной конференции, посвященной 100 - летию Заслуженного деятеля науки РСФСР, доктора ветеринарных наук, профессора А.Н. Каденации: Сб.науч.тр./ ИВМ ОмГАУ - Омск, 2004. - С. 170-177.

3. Павлов Ю.Н. Дифференциальная диагностика туберкулёза и эхинококкоза с помощью спектрофотометрии при возникновении неспецифических реакций у коров на ППД-туберкулин // Эпизоотология, патология и ветеринарно-санитарные мероприятия при инфекционных болезнях животных: Матер. Междунар. научно-практической конференции, посвященной 35-летию Сибирского отделения Российской академии сельскохозяйственных наук: Сб.науч.тр./ СО РАСХН. ВНИИБТЖ - Омск, 2004. - С. 55-61.

4. Павлов Ю.Н. Эхинококкоз крупного рогатого скота в Омской области и его влияние на аллергическую диагностику туберкулёза // Актуальные вопросы теоретической и практической паразитологии: Матер. Междунар. научно-производственной конференции, посвященной 100 - летию Заслуженного деятеля науки РСФСР, доктора ветеринарных наук, профессора А.Н. Каденации: Сб.науч.тр./ ИВМ ОмГАУ - Омск, 2004. - С. 177-180.

5. Павлов Ю.Н. Дифференциальная диагностика туберкулеза и ларвального эхинококкоза кроликов с помощью спектрофотометрии в эксперименте // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: Матер. IV-й Межрегиональной научно-практической конференции по проблемам ветеринарной медицины : Сб.науч.тр./ СО РАСХН. ВНИИБТЖ - Омск, 2005. - С. 181-186.

На правах рукописи

ПАВЛОВ
ЮРИЙ НИКОЛАЕВИЧ

ДИАГНОСТИКА ЛАРВАЛЬНОГО ЭХИНОКОККОЗА
С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

03 00.19 - Паразитология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Тюмень 2005

Рег №6 Сдано в набор 03.06.05 Подписано в печать 03.06.05
Печать на ризографе Бум офсетная Формат 60х84/16
Печ Л 1,25(1 16) Уч-изд л 1,5 Тираж 100 экз Заказ 18

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

13 июля 2005

