

На правах рукописи

КУВАРИН
Алексей Сергеевич

ИММУННЫЙ СТАТУС У ЖИВОТНЫХ,
ИНФИЦИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ МИКОБАКТЕРИЙ

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Новосибирск - 2005

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

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
Бажин Михаил Аристоклеви

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
старший научный сотрудник
Аликин Юрий Серафимови

кандидат ветеринарных наук, доцент
Магер Сергей Николаевич

Ведущая организация: Уральская государственная академия
ветеринарной медицины

Защита состоится « 31 _ » _____ мая _____ 2005 г. в « _14°_ » часов на заседании диссертационного совета Д.006.045.01 в Государственном научном учреждении Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН по адресу: 630501, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Краснообск, ИЭВСиДВ.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО РАСХН

Автореферат разослан « 18 » апреля _____ 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



СИ. Логинов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. 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.

Основным методом прижизненной диагностики туберкулеза является внутрикожная туберкулиновая проба с применением ППД-туберкулина для млекопитающих. Однако часто возникают неспецифические или парааллергические реакции на туберкулин, обуславливающие неясность эпизоотической ситуации, необоснованный убой продуктивных животных, потерю продукции и приплода, ограничение племенной работы, а также дополнительные затраты на дифференциальную диагностику.

Большинство исследователей (Т.И. Байтерякова, Ю.А. Макаров, 1982; Л.М. Каримова, Б.Я. Хайкин, 1987; Н.М. Колычев с соавт., 1990; Н.М. Колычев, 1992; Л.М. Каримова, 1998; Ю.Ю. Данко, 2000; А.И. Завгородний, 2000; А.С. Донченко и др., 2002; Н.П. Овдиенко и др. 2002), основной причиной появления парааллергических реакций на ППД-туберкулин для млекопитающих считают сенсибилизацию организма животных атипичными микобактериями.

В.М. Авилов с соавт., 1997 считают, что возникновение проблемы неспецифических реакций на туберкулин в неблагополучных по туберкулезу зонах свидетельствует об улучшении эпизоотической ситуации. Установлено, что инфицированность животных ассоциациями атипичных микобактерий сдерживает развитие патологического процесса, вызванного *M. bovis*, повышает защитные свойства вакцины БЦЖ и дает неопределенные результаты симультанной пробы с ППД туберкулином для млекопитающих и КАМ (С.Ю. Быкова, 1994). Известно, что атипичные микобактерии обладают иммуногенными свойствами и поддерживают противотуберкулезный иммунитет у животных в стадах, где одновременно нерсистируют атипичные и патогенные микобактерии (Н.Г. Кассирская, Д.Д. Меньшиков, 1965; М.П. Зыков, Т.Б. Ильина, 1978; О.В. Мартма, К.К. Тяхнас, 1986; А.А. Бойко, Е.П. Сапегина, 1991).

Совершенствование методов и средств профилактики микобактериозов основывается на знаниях иммунного статуса здоровых животных и инфицированных различными видами микобактерий. Иммунная система - это большая сложная система, компоненты которой ориентированы на выполнение единой цели, подчиняются законам функционирования больших систем и работают как единое целое. Она может функционировать в двух принципиально различающихся режимах: спокойного функционирования, достаточного для поддержания внутренней среды организма, и активной борьбы с внедрившимся чужеродным при воспалительном процессе (К.А. Лебедев, И.Д. Понякина, 2003).

Открытие ведущей роли Т- и В-лимфоцитов в иммунитете, их клеточной кооперации с макрофагами, разработка методов идентификации иммунокомпетентных клеток создают возможность более объективной оценки иммунного статуса животных. Контроль за изменениями в иммунной системе может осуществляться с помощью математического моделирования состояний, сущность которого состоит в том, что в системе выделяются несколько доминирующих для того или иного состояния компонентов и создают на их основе математическую модель, которая представляет собой уравнение или систему уравнений, связывающие несколько показателей в единое целое (Г.И. Марчук, Р.В. Петров, 1982; Г.И. Марчук, Л.Н. Белых, 1986). Исходя из этого, авторами предложен вариант регрессионного анализа - метод группировки иммунологических параметров (дискретно-динамический анализ), позволяющий описать иммунный статус животных на основе взаимосвязей параметров.

В последующем, указанный принцип был использован при составлении дифференциально-прогностических таблиц, с помощью которых прогнозируют формирование протективного иммунитета или патологии (М.А. Бажин, 1995; М.А. Бажин и др., 2003). Однако исследования иммунного статуса крупного рогатого скота, инфицированного различными видами микобактерий, на основе данного метода ранее не изучались.

Цель и задачи исследований. Цель — определить иммунный статус и взаимосвязи в системе иммунитета у животных, инфицированных различными видами микобактерий, и обосновать возможность его использования для профилактики микобактериозов у крупного рогатого скота.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

- определить иммунный статус у морских свинок, зараженных *M. bovis* и *M. phlei*, на основе взаимосвязей иммунологических параметров;
- изучить парааллергические реакции у морских свинок, привитых вакциной БЦЖ;
- определить иммунный статус у крупного рогатого скота, инфицированного атипичными микобактериями, на основе взаимосвязей иммунологических параметров;
- определить иммунный статус у коров, не реагирующих и реагирующих на ППД-туберкулин, а также, у привитых вакциной БЦЖ.

Научная новизна. С использованием иммунологических, а также корреляционного и регрессионного методов исследований определен иммунный статус у животных, инфицированных различными видами микобактерий. Установлен уровень иммунокомпетентных клеток в периферической крови и впервые изучены взаимосвязи в системе иммунитета у животных, инфицированных различными видами микобактерий. Установлено, что число животных с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток увеличивается.

Установлена роль вакцины БЦЖ в формировании иммунитета, способствующего подавлению парааллергических реакций у животных, инфицированных атипичными микобактериями.

Определены критерии оценки благополучия ферм по туберкулезу, позволяющие снять ограничения при наличии в стаде животных, реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих.

Практическая ценность. Эпизоотологически и иммунологически обоснована возможность совершенствования методов профилактики микобактериозов крупного рогатого скота. По материалам составлена заявка на изобретение "Способ профилактики парааллергических реакций".

Установлена возможность снятия ограничений по туберкулезу крупного рогатого скота при наличии в стаде животных, реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих, которая включает получение четырехкратных отрицательных результатов патологоанатомических и бактериологических исследований биоматериала от реагирующего крупного рогатого скота.

Апробация полученных результатов. Материалы диссертации доложены на конференции молодых ученых Сибирского региона, посвященной 175-летию Сибирской аграрной науки (г. Омск, 2003); Международной научной конференции, посвященной 175-летию аграрной науки Сибири (г. Омск, 2003); Международной научно-практической конференции "Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных" (г. Москва, 2003); Международной научно-практической конференции, посвященной 35-летию Сибирского отделения Российской академии сельскохозяйственных наук (г. Омск, 2004); Международной научно-производственной конференции, посвященной 100-летию профессора Н.Г. Кондюрина (г. Омск, 2004), Межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения заслуженного ветеринарного врача РФ И.В. Окунцова (г. Омск, 2005).

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

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 119 страницах компьютерного набора и включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, практические предложения и приложение. Список литературы представлен 287 источниками, в том числе 215 отечественных и 72 зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 17 таблицами, 4 рисунками.

На защиту выносятся:

1. Материалы по изучению иммунного статуса на основе взаимосвязей в системе иммунитета у животных, инфицированных различными видами микобактерий.

2. Рекомендации по профилактике микобактериозов крупного рогатого скота и критерии благополучия ферм по туберкулезу.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнена в отделе туберкулеза ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных (ВНИИБТЖ) Сибирского отделения Россельхозакадемии, секторе иммунитета и специфической профилактики туберкулеза, ОПХ и хозяйствах Омской области в период 2001-2004 гг. по заданию НИР 02.01.08. «Разработать новые методы иммунологической защиты животных на основе применения молекулярных препаратов и методов оценки иммунологических феноменов».

Эпизоотическую ситуацию по туберкулезу крупного рогатого скота, в том числе распространение неспецифических туберкулиновых реакций, изучали по данным ветеринарной отчетности и на основании материалов собственных аллергических и бактериологических исследований. Использованы также данные мясоперерабатывающих предприятий.

Материалом для исследования служила периферическая кровь 110 голов: из них 100 коров и 10 молодняка крупного рогатого скота, 90 из благополучных и 20 из неблагополучных по туберкулезу хозяйств. В опытах с заражением культурами возбудителя туберкулеза бычьего вида и атипичными микобактериями использовано 109 морских свинок массой 350-400г.

Лабораторных животных содержали в условиях вивария, кормление осуществляли согласно нормам рациона для лабораторных животных (Е. А. Финкель, Л.В. Михайлова, 1976). За подопытными животными вели постоянное наблюдение, в опыт брали только клинически здоровых животных.

Лабораторных животных заражали культурами полевых производственных штаммов *M. bovis* (шт. 14), *M. phlei* и смесью атипичных микобактерий, изолированных во ВНИИБТЖ от реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота неблагополучных по туберкулезу хозяйств региона Сибири.

Для аллергических исследований использовали ППД-туберкулин для млекопитающих производства Курской биологической фабрики.

Количество Т-лимфоцитов в периферической крови определяли в реакции спонтанного розеткообразования (Е-рок); лимфоцитов-киллеров - в реакции непрямого глобулинового розеткообразования (ЕА-рок); В-лимфоцитов - в реакции комплементарного розеткообразования (ЕАС-рок); иммунокомпетентные клетки, распознающие антигены микобактерий - с помощью розеткообразования с эритроцитами быка (ЕТ-рок), адсорбированными ППД-туберкулин (М.А. Бажин с соавт., 1989).

Окраску мазков крови, подсчет лейкоцитов и выведение лейкоцитарной формулы проводили по общепринятым методикам.

Математическую обработку данных проводили с помощью корреляционного и дискретно-динамического анализа, сущность которого состоит в том, что исследуемую группу животных делят по значению одного из параметров, принятого в качестве базисного, на три приблизительно равные по величине груп-

пе. В 1-ю входят животные с минимальными значениями базисного параметра, во 2-ю - с максимальными и в 3-ю - со средними значениями. В каждой подгруппе рассчитывают среднее значение остальных (вариабельных) параметров. В случаях, когда средние значения вариабельного параметра в подгруппах с минимальными и максимальными значениями базисного параметра достоверно различаются, констатируют наличие взаимосвязей между данными базисного и вариабельного параметрами. Взаимосвязь положительна, если при увеличении базисного параметра уровень вариабельного также увеличивается; отрицательна, если при увеличении базисного параметра уровень вариабельного снижается.

В работе использовали две подгруппы — с минимальными и максимальными значениями, так как подгруппа со средними значениями существенно не отражает взаимосвязь исследуемых параметров. Для оценки существенности различий между двумя средними величинами M_x и M_y использовали t-критерий по Стьюденту (В.Ю. Урбах, 1964; А.Т. Усович, П.Т.Лебедев,1970). Экономический ущерб определили по методике Ю.И. Смолянинова с соавт. (2004).

2.2. Региональные особенности эпизоотологии неспецифических реакций на туберкулин у крупного рогатого скота и обоснование схемы борьбы с ними

Эпизоотическая ситуация по туберкулезу крупного рогатого скота в Омской области характеризуется стабильным и равномерным улучшением. Так, в 1990 году в области числилось 83 неблагополучных пунктов, в которых выявлено 5800 гол. больного туберкулезом скота, тогда как на конец 2004 года количество неблагополучных пунктов снизилось до 4, или в 20,7 раз, заболевшего туберкулезом скота уменьшилось до 5, или в 1160 раз.

Другой показатель улучшения эпизоотической ситуации по туберкулезу крупного рогатого скота в области в этот период — снижение выявляемости туберкулезных поражений в органах и тканях животных при сдаче на мясокомбинат с 3,8тыс. до 300, или в 12,6 раза. При анализе эпизоотологических показателей (неблагополучные пункты, заболеваемость, пораженность органов) установлено искажение истинной эпизоотической ситуации по туберкулезу крупного рогатого скота. Так, в Омской области с 1990 по 2004 год, на мясокомбинате выявляют значительно больше туш с туберкулезными поражениями, чем число заболевших за год животных.

Анализ динамики выявления реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота в хозяйствах Омской области за последние 15 лет (1990 - 2004гг.) показал, что проблема неспецифической реактивности к туберкулину продолжает усиливаться. Так, если в 1990 г., соотношение реагирующих на туберкулин животных в неблагополучных и благополучных стадах составляло 1:3,3 то в 2004 году 1:447.

Регистрируемые аллергические реакции у значительного числа крупного рогатого скота в благополучных пунктах в десятки раз превышают число реагирующих в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах. Проявляемые парааллергические реакции искажают достоверную информацию об истинном эпизоотическом состоянии благополучных хозяйств и приводят к значительным экономическим потерям из-за необоснованного убоя здоровых животных. Экономический ущерб на одну реагирующую голову крупного рогатого скота составляет 4352 руб., а общий ущерб за 5 лет (1999-2004) по Омской области - 91130,8 тыс. руб.

В связи с огромным экономическим ущербом, наносимым парааллергическими реакциями на ППД-туберкулин для млекопитающих, мы разработали схему профилактики микобактериозов.

Установлено, что парааллергические реакции на ППД-туберкулин для млекопитающих, вызванные распространением в окружающей среде атипичных микобактерий, можно нейтрализовать, создавая у животных противотуберкулезный иммунитет вакциной БЦЖ.

Первоначально иммунизируют телочек в возрасте 10-20 дней вакциной БЦЖ внутривенно в дозе 1 мг на животное. Через 30-45 дней проводят внутривенные аллергические исследования ППД-туберкулином для млекопитающих по общепринятой методике. Не реагирующих животных и с реакциями более 15 мм отправляют на откорм с последующим убоем. Из остальных животных формируют группы для выращивания ремонтного молодняка. Через 12-14 месяцев их исследуют с помощью ППД-туберкулина для млекопитающих. Всех не реагирующих ревакцинируют БЦЖ в той же дозе и проводят аллергические исследования через 30-45 дней по той же методике.

Вместе с тем, в неблагополучном по туберкулезу стаде также возможно проявление парааллергических реакций которые ввиду отсутствия надежного способа дифференциации, учитываются как специфические, с последующим убоем таких животных.

С целью усовершенствования положений, по снятию ограничений по туберкулезу при регулярном выявлении реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота, совместно с сотрудниками ИЭВС и ДВ разработаны рекомендации "Снятие ограничений по туберкулезу при регулярном выявлении реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота". Предложенная схема предусматривает ежеквартальные, в течение года, аллергические исследования поголовья на туберкулез, убой всех реагирующих на туберкулин животных с тщательной ветеринарно-санитарной экспертизой внутренних органов и лимфоузлов и, при отсутствии туберкулезных поражений, бактериологическое исследование биоматериала. При этом срок между аллергическими исследованиями поголовья - 3 мес, достаточен для проведения бактериологической экспертизы на туберкулез. Если на любом этапе исследований туберкулез подтвержден патологоанатомическим или бактериологическим исследованием,

применение схемы прекращают и продолжают проводить оздоровительные мероприятия.

При получении четырех отрицательных результатов указанных тестов, или индикации из биоматериала атипичных микобактерий ферму (стадо) признают благополучной по туберкулезу и после проведения соответствующих закрепительных мероприятий (санитарный ремонт помещений, дезинфекция) снимают ограничения. Следует отметить, что при выделении атипичных микобактерий на первом, втором и третьих этапах комплексные исследования (аллергические, патологоанатомические, бактериологические) не прекращают до получения четырехкратных результатов.

2.3. Иммунный статус у морских свинок, зараженных *M. bovis* и *M. phlei*

2.3.1. Клеточные реакции у морских свинок, зараженных *M. bovis* и *M. phlei*

В опыт отобрали 16 морских свинок массой 350-400 г., предварительно исследованных и не реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих в дозе 25 МЕ. Сформированы 4 группы по 4 морские свинки.

Свинок 1-й группы заразили подкожно в область левого паха вирулентной культурой *M. bovis* (шт. 14) в дозе 0,0001 мг; 2-й группы подкожно в область левого паха вирулентной культурой *M. bovis* (шт. 14) в той же дозе и подкожно в область правого паха культурой *M. phlei* в дозе 1 мг на животное. Морских свинок 3-й группы инфицировали подкожно в область правого паха культурой *M. phlei* в дозе 1 мг. Морские свинки 4-й группы были контрольные. Содержание иммунокомпетентных клеток в периферической крови морских свинок всех групп определяли до и через 15, 30, 37, 52, 60 дней после заражения.

В начальный период иммунного ответа наблюдали снижение в периферической крови иммунокомпетентных клеток и к 37 дню установлена тенденция к резкому увеличению количества основных иммунокомпетентных клеток по сравнению с контролем. Достоверно ($P < 0,05$), отмечено увеличение иммунокомпетентных клеток у морских свинок опытных групп, за исключением Т-лимфоцитов во 2-й и 3-й группах, содержание которых увеличилось, но не достигало достоверных отличий. Такая же закономерность отмечена и на 52 день. На 60 день количество иммунокомпетентных клеток у животных всех групп сохранялось на высоком уровне.

Далее провели сравнительный анализ количества иммунокомпетентных клеток с помощью вариационной статистики у морских свинок, зараженных *M. bovis* и инфицированных *M. phlei*. Установлено, что на 37 день уменьшается количество Т-лимфоцитов у животных зараженных *M. bovis* и *M. phlei* по отношению к морским свинкам, зараженных *M. bovis*.

Патологоанатомические исследования органов морских свинок показали, что у животных 1-й, 2-й и 3-й групп показатель интенсивности поражений (В) соответственно равен 8,6; 6,3; 0. Этот показатель у морских свинок, инфициро-

ванных *M. phlei*, достоверно уменьшается по сравнению с показателями животных, зараженных *M. bovis* (соответственно: $6,33 \pm 0,98$; $8,6 \pm 0,24$, $P < 0,05$).

Следовательно, инфицирование морских свинок *M. bovis* и *M. phlei* вызывает в организме животных иммунологические реакции, которые проявляются в увеличении числа всех иммунокомпетентных клеток у морских свинок на 37 и 52 дни числа Т-, В-лимфоцитов и антигенреактивных лимфоцитов в 1-ой и во 2-ой группах. К тому же показатель интенсивности туберкулезных поражений у животных, инфицированных *M. bovis* и *M. phlei*, достоверно уменьшается по сравнению с показателями у животных, зараженных только *M. bovis*.

2.3.2. Взаимосвязи в системе иммунитета у морских свинок, зараженных *M. bovis* и *M. phlei*

Из 80 морских свинок массой 350-400 г сформировали 4 группы по 20 голов в каждой. Животных 1-й группы заразили *M. bovis* в дозе 0,0001 мг, подкожно в левую область паха. Животных 2-й группы заразили подкожно *M. bovis* в дозе 0,0001 мг в левую область паха и *M. phlei* в дозе 1 мг в правую область паха. Морских свинок 3-й группы инфицировали *M. phlei* подкожно в дозе 1 мг на животное в правую область паха. Животные 4-й группы были контрольными. Кровь для исследования взяли через 2 месяца после инфицирования.

Отмечено резкое увеличение числа всех иммунологических клеток ($P < 0,05$), кроме количества нейтрофилов, показатели которых увеличиваются незначительно, тогда как количество нейтрофилов у морских свинок 3-й группы снижается (соответственно: $4,74 \pm 0,24$, $2,6 \pm 0,27$, $P < 0,05$).

При изучении корреляционных связей иммунологических параметров у морских свинок после заражения установлены в основном прямые связи средней силы. Отмечена тесная прямая связь между числом Т-лимфоцитов и антигенреактивных лимфоцитов ($r = +0,78$). Сильная положительная связь отмечена у животных, инфицированных *M. phlei*, между числом Т-киллеров и антигенреактивных лимфоцитов ($r = +0,78$). Остальные параметры характеризовались слабыми положительными связями. У животных, зараженных *M. bovis*, а также *M. bovis* и *M. phlei*, наблюдается ослабление корреляционных связей, которые характеризуются преимущественно как слабые прямые при заражении *M. bovis*, и как обратные слабой силы при заражении *M. bovis* и *M. phlei*.

Дискретно-динамическим анализом у морских свинок 1-й группы выявлено 9 пар сочетаний: при базисном Т-лимфоциты с переменным антигенреактивные лимфоциты и нейтрофилы; при базисном В-лимфоциты с переменным Т-киллеры; при базисном Т-киллеры с переменным Т-лимфоциты; при базисном антигенреактивные лимфоциты с переменным Т- и В-лимфоциты и нейтрофилы. Две пары сочетаний выявлено у морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. phlei*: при базисном Т-лимфоциты с переменным Т-киллеры; при базисном нейтрофилы с переменным Т-киллеры. При базис-

ных В-лимфоциты, Т-киллеры и антигенреактивные лимфоциты, достоверно различающихся пар ($P < 0,05$) не установлено. Выявлено две пары сочетаний у животных, инфицированных *M. phlei*: при базисе Т-лимфоциты с переменным Т-киллеры; при базисном антигенреактивные лимфоциты в переменным В-лимфоциты. При базисном В- лимфоциты, Т-киллеры и нейтрофилы сочетаний пар достоверно различающихся ($P < 0,05$) не установлено. Среди интактных животных выявлено 10 значимых сочетаний. У морских свинок, зараженных *M. bovis* и *M. phlei* и инфицированных *M. phlei*, по 2 значимых сочетания.

В дальнейшем, используя значения базисного и переменного параметров, составили дифференциально-прогностические таблицы для иммунного состояния каждого животного. Если показатели числа иммунокомпетентных клеток животного соответствуют хотя бы одному из сочетаний (базисного, переменного) таблицы, такие животные признаются с высокой степенью активности иммунокомпетентных клеток.

При анализе дифференциально-прогностических таблиц с высокой активностью иммунокомпетентных клеток установлено: 40% среди интактных, 45% среди инфицированных *M. phlei* и 20% среди зараженных *M. bovis* и *M. phlei* морских свинок. У животных, зараженных *M. bovis*, взаимосвязи в системе иммунитета не выявлены.

2.4. Парааллергические реакции у морских свинок, привитых вакциной БЦЖ

Была приготовлена суспензия смеси атипичных микобактерий (*M. avium* - 30%; *M. smegmatis*, *M. phlei* - 20%; полевые штаммы: № 312-Ш гр. по Раньону - 25%; № 2-20%; № 251, 245, 122 - 5% сапрофиты), способная вызвать кожную реакцию на ППД-туберкулин. Для этого трем морским свинкам ввели по 0,1 мг ассоциации, через 24 часа дополнительно 1-й и 2-й свинкам ввели 0,5 мг смеси (1-я группа). В дальнейшем эти животные служили в качестве контроля. Установлено, что однократное введение смеси в дозе 0Д мг вызывает у морских свинок кожную реакцию на ППД-туберкулин для млекопитающих, которая сохраняется в течение 11-ти месяцев. 5 морских свинок были иммунизированы БЦЖ в дозе 0,1 мг на животное и через 12 месяцев были ревакцинированы БЦЖ в той же дозе (2-я группа). Другим 5-ти морским свинкам была первоначально введена БЦЖ в дозе 0Д мг (3-я группа).

Через 11 месяцев морских свинок всех групп инфицировали суспензией атипичных микобактерий в дозе 0,1 мг на голову. Через 1,5 месяца аллергические реакции проявились у всех животных 1-й группы, в то же время у вакцинированных и ревакцинированных БЦЖ аллергических реакций не установлено (2-я и 3-я группы).

Спустя 30 дней после вакцинации и угасания кожных аллергических реакций морских свинок всех групп вновь инфицировали ассоциацией атипичных микобактерий в дозе 0,1 мг на голову.

Через 1,5 месяца после инфицирования кожные туберкулиновые реакции установлены у морских свинок 1-й группы, в то время как у животных 2-й и 3-й таких реакций не установлено.

Таким образом, иммунитет, создаваемый вакциной БЦЖ, нейтрализует у морских свинок развитие парааллергических реакций.

2.5. Оценка иммунного статуса на основе взаимосвязей в системе иммунитета у крупного рогатого скота, инфицированного атипичными микобактериями

В опыт было взято 10 голов крупного рогатого скота из благополучного по туберкулезу хозяйства, не реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих в возрасте 2-2,5 лет. Из которых сформированы 2 группы по 5 животных.

Животных 1-й группы инфицировали смесью атипичных микобактерий (*M. avium*, *M. smegmatis*, *M. phlei*) методом выпаивания общей заражающей дозы однократно в нарастающих дозах, проводя одновременно титрацию заражающей дозы по следующей схеме:

1-е животное инфицировали в дозе 1 мг/кг массы тела, 2-е - в дозе 2 мг/кг массы тела, 3-е - в дозе 3 мг/кг массы тела, 4-е - в дозе 4 мг/кг массы тела, 5-е - в дозе 5 мг/кг массы тела. В течение эксперимента за животными вели клинические наблюдения.

Животные 2-й группы были привиты вакциной БЦЖ дважды (10-20 дней и в возрасте 14-16 мес).

Животных, инфицированных атипичными микобактериями, через 45 дней исследовали аллергической пробой и установили кожную реакцию только у 5-го животного на дозу 5 мг/кг массы тела. Через месяц, после инфицирования 1-ой группы, животным обеих групп ввели суспензию атипичных микобактерий тем же способом в дозе 5 мг/кг. Через 45 дней после введения микобактерий аллергические реакции на ППД-туберкулин установлены только у 2-х животных 1-й группы, в то время как у животных 2-й группы после заражения смесью микобактерий аллергических реакций не установлено.

Таким образом, двукратная иммунизация вакциной БЦЖ у крупного рогатого скота, привитого в возрасте до 20 дней и ревакцинированного в 14-16 месяцев, нейтрализует у животных парааллергические реакции. В то же время, инфицирование крупного рогатого скота атипичными микобактериями существенно не изменяет в периферической крови животных состава иммунокомпетентных клеток, по сравнению с неинфицированными, но при этом усиливает у них взаимосвязи иммунологических параметров, увеличивая число значимых сочетаний параметров и количество животных (68%) с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток.

2.6. Иммунный статус у коров, нереагирующих и реагирующих на ППД-туберкулин и привитых вакциной БЦЖ

Проведены сравнительные изучения иммунного статуса у коров благополучного по туберкулезу стада: нереагирующих и реагирующих на ППД-туберкулин; привитых вакциной БЦЖ; а также реагирующих коров из неблагополучного по туберкулезу стада.

Исследовали периферическую кровь от коров 4-х групп: 30 нереагирующих и 30 коров реагирующих на ППД-туберкулин (АО «Конезавод» Марьяновского района, благополучное по туберкулезу крупного рогатого скота); 20 коров, привитых вакциной БЦЖ (через 11 мес. после вакцинации) нереагирующие (СПК «Новосанжаровское» Русско-Полянского района, благополучное по туберкулезу крупного рогатого скота); 20 коров, реагирующих на ППД-туберкулин (СПК «Россия» Исылкульского района, неблагополучное по туберкулезу).

Содержание иммунокомпетентных клеток в периферической крови показало, что у привитых БЦЖ коров достоверно увеличено по отношению к нереагирующим животным количество Т- и В-лимфоцитов и Т-киллеров (соответственно $P < 0,05$; $P < 0,001$; $P < 0,05$), а содержание антигенреактивных лимфоцитов и нейтрофилов снижено (соответственно: $P < 0,05$; $P < 0,001$). Уменьшенное количество Т-лимфоцитов и нейтрофилов отмечено у реагирующих животных из благополучного хозяйства (соответственно $P < 0,05$; $P < 0,001$). Содержание В-лимфоцитов, Т-киллеров и антигенреактивных лимфоцитов достоверно увеличено (соответственно $P < 0,001$; $P < 0,01$; $P < 0,001$). Сниженное число Т-лимфоцитов отмечается у коров, реагирующих на ППД-туберкулин, из благополучного хозяйства ($P < 0,001$) и незначительно снижено содержание антигенреактивных лимфоцитов и нейтрофилов. Количество В-лимфоцитов увеличено по отношению к нереагирующим животным ($P < 0,001$).

Корреляционные связи иммунологических параметров у нереагирующих и привитых БЦЖ животных установлены в основном прямые средней силы. У реагирующих животных из благополучного хозяйства отмечены прямые тесные связи между числом Т-лимфоцитов и Т-киллеров ($r = +0,72$), Т- и В-лимфоцитов ($r = +0,80$) и числом В-лимфоцитов и Т-киллеров ($r = +0,80$). В остальных случаях преимущественно отмечаются прямые связи слабой силы. У коров, реагирующих на ППД-туберкулин из благополучного хозяйства, отмечена прямая тесная корреляция между числом Т-лимфоцитов и антигенреактивных лимфоцитов ($r = +0,71$). В остальных случаях отмечаются преимущественно прямые связи средней силы.

Дискретно-динамический анализ иммунологических параметров у нереагирующих коров выявил 4 значимых сочетания параметров (табл. 1).

Таблица 1. - Дифференциально- прогностическая таблица для оценки иммунного статуса у нереагирующих коров из благополучного хозяйства, тыс/мкл

№ п/п	Сочетание: переменный параметр (базис)	n	t-критерий по Стьюденту	Вариабельный	Базис
1	T-киллеры (T-лимфоциты)	30	3,36	≤ 0,42	≤ 0,84
2	T-киллеры (антигенреактивные)		2,75	≤ 0,42	≤ 0,30
3	Лейкоциты (T-лимфоциты)		2,71	≤ 6,90	≤ 0,89
4	Антигенреактивные (T-киллеры)		2,33	≤ 0,26	≤ 0,37
Количество животных с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток		9	30%.		

Среди реагирующих животных, из благополучного хозяйства представлено 16 значимых сочетаний параметров (табл. 2) и только одно сочетание совпадает с сочетанием у нереагирующих коров (лейкоциты в качестве базисного параметра взаимосвязаны с T - лимфоцитами).

Таблица 2. - Дифференциально-прогностическая таблица для оценки иммунного статуса у реагирующих коров из благополучного хозяйства, тыс/мкл

№ п/п	Сочетание: переменный параметр (базис)	n	t-критерий по Стьюденту	Вариабельный	Базис
1	Антигенреактивные лимфоциты (T-лимфоциты)	30	4,37	≤ 0,28	≤ 0,29
2	T-лимфоциты (антигенреактивные лимфоциты)		4,03	≤ 0,37	≤ 0,19
3	T-киллеры (лейкоциты)		3,79	≤ 0,31	≤ 6,36
4	Лейкоциты (T-киллеры)		3,65	≤ 6,8	≤ 0,43
5	Лейкоциты (антигенреактивные лимфоциты)		3,16	≤ 6,8	≤ 0,23
6	Нейтрофилы (B-лимфоциты)		3,14	≤ 1,6	≤ 0,66
7	Лейкоциты (B-лимфоциты)		2,94	≤ 6,8	≤ 0,72
8	B-лимфоциты (лейкоциты)		2,94	≤ 0,64	≤ 6,9
9	Антигенреактивные лимфоциты (B-лимфоциты)		2,9	≤ 0,28	≤ 0,77
10	Лейкоциты (T-лимфоциты)		2,69	≤ 6,8	≤ 0,52
11	B-лимфоциты (T-киллеры)		2,63	≤ 0,64	≤ 0,39
12	Антигенреактивные (лейкоциты)		2,41	≤ 0,28	≤ 7,18
13	B-лимфоциты (антигенреактивные лимфоциты)		2,34	≤ 0,64	≤ 0,28
14	Нейтрофилы (T-киллеры)		2,22	≤ 1,6	≤ 0,46
15	B- лимфоциты (T-лимфоциты)		2,12	≤ 0,64	≤ 0,5
16	T-киллеры (B-лимфоциты)		2,12	≤ 0,31	≤ 0,84
Количество животных с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток		18	60%.		

Среди животных, привитых БЦЖ, выявили 18 пар значимых сочетаний параметров (табл. 3).

У реагирующих животных из неблагополучного хозяйства представлены 8 значимых сочетаний параметров (табл. 4). Выявлено вновь 2 сочетания параметров, которые не совпадают с сочетанием параметров у нереагирующих и реагирующих коров, из благополучного хозяйства (нейтрофилы в качестве базисного параметра осуществляют свою функцию с Т- и В-лимфоцитами). Используя дифференциально - прогностические таблицы (1-4), оценивали каждого животного исследуемых групп по всем значимым сочетаниям параметров. Если показатели числа иммунокомпетентных клеток животного соответствовали интервалам хотя бы одного из сочетаний (базисного, переменного) таблицы, таких животных признавали с высокой активностью иммунокомпетентных клеток.

Таблица 3. - Дифференциально-прогностическая таблица для оценки иммунного статуса у привитых БЦЖ коров, тыс/мкл

№ п/п	Сочетание: переменный параметр (базис)	n	t-критерий по Стьюденту	Вариационный	Базис
1	Лейкоциты (В-лимфоциты)	20	10,22	$\leq 5,7$	$\leq 1,03$
2	В-лимфоциты (лейкоциты)		6,72	$\geq 2,38$	$\geq 9,8$
3	Т-киллеры (В-лимфоциты)		6,50	$\leq 0,62$	$\geq 1,23$
4	Т-лимфоциты (В-лимфоциты)		6,04	$\leq 1,06$	$\geq 1,09$
5	Т-киллеры (лейкоциты)		4,62	$\leq 0,62$	$\geq 6,05$
6	Т-лимфоциты (лейкоциты)		4,38	$\leq 1,06$	$\geq 5,38$
7	Лейкоциты (Т-лимфоциты)		4,26	$\leq 5,7$	$\geq 0,99$
8	Т-киллеры (Т-лимфоциты)		3,11	$\leq 0,62$	$\geq 1,31$
9	Лейкоциты (Т-киллеры)		3,02	$\leq 5,7$	$\geq 0,57$
10	Нейтрофилы (антигенреактивные лимфоциты)		2,97	$\leq 0,87$	$\geq 0,22$
11	В-лимфоциты (Т-лимфоциты)		2,88	$\leq 1,17$	$\geq 1,12$
12	Антигенреактивные лимфоциты (Т-лимфоциты)		2,61	$\leq 0,22$	$\geq 1,48$
13	В-лимфоциты (Т-киллеры)		2,61	$\leq 1,17$	$\geq 0,64$
14	Т-киллеры (нейтрофилы)		2,51	$\leq 0,22$	$\geq 1,13$
15	Нейтрофилы (В-лимфоциты)		2,23	$\leq 0,87$	$\geq 1,51$
16	Т-лимфоциты (Т-киллеры)		2,25	$\leq 1,06$	$\geq 0,57$
17	Нейтрофилы (Т-лимфоциты)		2,45	$\leq 0,87$	$\geq 1,05$
18	Т-лимфоциты (нейтрофилы)		2,46	$\leq 1,06$	$\geq 0,95$
Количество животных с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток		10	50%		

Таблица 4. - Дифференциально-прогностическая таблица для оценки иммунного статуса у реагирующих коров из неблагополучного хозяйства, тыс/мкл

№ п/п	Сочетание: вариабельный параметр (базис)	n	t-критерий по Стьюденту	Вариабельный	Базис
1	В-лимфоциты (нейтрофилы)	20	3,71	≤ 0,92	≤ 0,52
2	Т-лимфоциты (антигенреактивные лимфоциты)		2,31	≤ 0,52	≤ 0,78
3	Антигенреактивные лимфоциты (Т-лимфоциты)		3,01	≤ 0,78	≤ 0,51
4	Т-лимфоциты (лейкоциты)		2,56	≤ 0,52	≤ 0,56
5	Лейкоциты (Т-лимфоциты)		2,44	≤ 5,1	≤ 0,56
6	Антигенреактивные лимфоциты (лейкоциты)		2,33	≤ 0,78	≤ 6,03
7	Т-лимфоциты (нейтрофилы)		2,30	≤ 0,52	≤ 0,59
8	Лейкоциты (антигенреактивные лимфоциты)		2,23	≤ 5,1	≤ 0,85
Количество животных с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток		8	40%		

Полученные результаты позволяют заключить, что с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток среди реагирующих на ППД-туберкулин коров из благополучного хозяйства выявлено 60% животных, среди реагирующих животных из неблагополучного хозяйства 40% и не реагирующих из благополучного 30%. Среди привитых вакциной БЦЖ выявлено 50% коров с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток.

За помощь в выполнении работы выражаем большую благодарность А.С. Донченко, Ю.И. Смолянинову, В.Ф. Бордюгу, Н.Н. Кошееву.

4. ВЫВОДЫ

1. Анализ распространения аллергических реакций у крупного рогатого скота в хозяйствах Омской области показал, что значительное число здоровых животных реагируют на ППД-туберкулин для млекопитающих. Неспецифические туберкулиновые реакции осложняют профилактику и выполнение системы мер борьбы с туберкулезом. Экономический ущерб, наносимый неспецифическими реакциями на одну реагирующую голову крупного рогатого скота составляет 4352 руб., а общий ущерб за 5 лет (1999-2004) по Омской области 91130,8 тыс. руб.

2. Двукратная иммунизация вакциной БЦЖ морских свинок, ревакцинированных через 12 мес, и крупного рогатого скота инфицированного смесью атипичных микобактерий, ранее привитого в возрасте до 20 дней и ревакцинированного в возрасте 14-16 мес. нейтрализует проявление парааллергических реакций. Можно предположить, что противотуберкулезный иммунитет разру-

шает в организме атипичные микобактерии и препятствует развитию кожных туберкулиновых реакций.

3. Установлена возможность снятия ограничений по туберкулезу крупного рогатого скота при наличии в стаде животных, инфицированных атипичными микобактериями и реагирующих на ППД-туберкулин. Схема предусматривает получение четырехкратных отрицательных результатов патологоанатомических и бактериологических исследований биоматериала от реагирующих животных.

4. Клеточные реакции у морских свинок, инфицированных *M. bovis*, *M. phlei* и смесью этих микобактерий, сопровождаются кратковременным снижением в периферической крови числа иммунокомпетентных клеток с последующим резким повышением их количества с 37-го дня. К 60-му дню уровень этих клеток снижается до уровня контрольных животных. Наиболее значительные изменения числа клеток установлены у морских свинок, зараженных *M. bovis*.

5. Иммунный ответ у морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. phlei*, сопровождается умеренным изменением в периферической крови количества иммунокомпетентных клеток и снижением показателя интенсивности туберкулезных поражений (В), тогда как у морских свинок, инфицированных *M. bovis*, этот показатель существенно выше ($6,33 \pm 0,98$; $8,6 \pm 0,24$; $P < 0,05$).

6. Результаты по изучению взаимосвязей иммунологических параметров, определяемые дискретно-динамическим анализом, подтверждают, что атипичные микобактерии (*M. phlei*) стимулируют систему иммунитета и увеличивают число морских свинок с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток (45%), тогда как *M. bovis* и *M. phlei* уменьшают число таких животных (20%). *M. bovis* нарушают взаимосвязи в системе иммунитета, что сопровождается гибелью морских свинок.

7. Инфицирование крупного рогатого скота атипичными микобактериями существенно не изменяет в периферической крови животных состава иммунокомпетентных клеток по сравнению с неинфицированными, но при этом усиливает у них взаимосвязи иммунологических параметров, увеличивает число значимых сочетаний параметров и количество животных (68%) с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток. В благополучном по туберкулезу крупного рогатого скота стаде из числа реагирующих на ППД-туберкулин выделяется до 60% коров с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток, из числа нереагирующих - до 30% и в неблагополучном стаде - до 40%.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Рекомендации "Снятие ограничений по туберкулезу при регулярном выявлении реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота" утверждены подсекцией "Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальне-

го Востока" отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии, протокол № 5 от 10 января 2003г.

2. Приоритетная справка на изобретение "Способ профилактики парааллергических реакций" №2004111059 от 14 апреля 2004г, и уведомление о положительном результате формальной экспертизы № 2004111059/14 (011838).

3. Теоретические и экспериментальные материалы по определению иммунного статуса у животных, инфицированных различными видами микобактерий целесообразно использовать в лекционных курсах по специальности ветеринария в высших учебных заведениях.

СПИСОК опубликованных работ по теме диссертации

1. Снятие ограничений по туберкулезу при регулярном выявлении реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота / Соавт.: Ю.И. Смолянинов, В.Ф. Бордюг // Матер, конф. молодых ученых Сиб. региона, посвященной 175-летию Сиб. аграрной науки: Сб. науч. тр. СибНИИСХ. - Омск, 2003. - С. 132-133.

2. Оценка иммунного статуса у крупного рогатого скота, инфицированного атипичными микобактериями / Соавт.: В.С. Власенко, А.Н. Новиков, Н.Н. Кошеев // Матер, межд. науч.-практ. конф. посвященной 175-летию аграрной науки Сибири: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. - Омск, 2003. - С. 131-138.

3. Иммунопрофилактика в комплексе противотуберкулезных мероприятий / Соавт.: М.А. Бажин, Ю.И. Смолянинов и др. // Ветеринарная патология. - № 1-2.-2004.-С. 139-142.

4. Взаимосвязи в системе иммунитета у здорового, реагирующего и больного туберкулезом крупного рогатого скота / Соавт.: М.А. Бажин, В.С. Власенко, А.Н. Новиков, В.Ф. Бордюг // Эпизоотология, патология и ветеринарно-санитарные мероприятия при инфекционных болезнях животных: Матер. Междунар. науч.-практ. конф. посвященной 35-летию СО РАСХН: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. - Омск, 2004. - С. 28-33.

5. Клеточные реакции у здорового, реагирующего и больного туберкулезом крупного рогатого скота / Там же. - С. 44-49.

6. Вакцинопрофилактика в комплексе противотуберкулезных мероприятий / Соавт.: М.А. Бажин, В. С. Власенко, А.Н. Новиков // Мат. Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию со дня рождения И.Г. Кондюрина / ФГОУ ОмГАУ. - Омск, 2004. - С. 345-350.

7. Взаимосвязи в системе иммунитета у морских свинок инфицированных различными видами микобактерий / Соавт.: М.А. Бажин, В. С. Власенко, А.Н. Новиков // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: Матер. 4-й межрегиональной науч.-практ. конф., посвященной 100-летию И.В. Окунцова: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. - Омск, 2005. - С. 28-32.

КУВАРИН
Алексей Сергеевич

**ИММУННЫЙ СТАТУС У ЖИВОТНЫХ,
ИНФИЦИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ МИКОБАКТЕРИЙ**

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Сдано в набор 14.04.2005
Подписано к печати 11.04.2005
Формат бумаги 60x84 1/16.
Печать оперативная. Гарнитура Times New Roman
Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз.

ГНУ ВИИБТЖ СО РАСХН

Отпечатано с оригинал-макета
в типографии ООО «Вариант-Омск»
644122, г. Омск, ул. Яковлева, 5. Тел./факс: 250-354

19 11/11/2005 **2463**