

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ОМСКИЙ АГРАРНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР»**

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА, ПРОФИЛАКТИКА И
КОНТРОЛЬ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ
У ЖИВОТНЫХ**

Методические рекомендации

ОМСК – 2023

УДК 619:616.982.2:543.39

ББК 48

Д-503

Рецензенты:

Плешакова В.И. – заведующая кафедрой ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней Омского государственного аграрного университета (ФГБОУ ВО Омский ГАУ им. П.А. Столыпина), доктор ветеринарных наук, профессор;

Баратов М.О. – главный научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии Прикаспийского зонального научно-исследовательского ветеринарного института – филиала ФГБНУ «Федерального аграрного научного центра Республики Дагестан» (Прикаспийский ЗНИВИ – филиал «ФАНЦ РД»), доктор ветеринарных наук.

Д-503 Дифференциальная диагностика, профилактика и контроль микобактериальных инфекций у животных: методические рекомендации / Н.А. Денгис, Е.А. Кособоков, В.С. Власенко, Н.Н. Новикова. – Омск: ФГБНУ «Омский АНЦ», 2023. – 20 с.

ISBN 978-5-98559-038-8

В методических рекомендациях представлено описание алгоритма аллергической дифференциальной диагностики, осуществляемой в хозяйствах, в которых при введении ППД туберкулина регистрируют неспецифические реакции, обусловленные нетуберкулезными микобактериями, схемы специфической профилактики микобактериозов, а также методов, позволяющих вести эффективный контроль за микобактериальной инфекцией.

Рекомендации предназначены для специалистов ветеринарных научно-исследовательских институтов, ВУЗов и лабораторий, проводящих исследования в области разработки новых методов и средств иммунологической защиты животных.

*Утверждено на заседании Ученого совета
ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»
(протокол №1 от 22 марта 2023 г.)*

ISBN 978-5-98559-038-8

УДК 619:616.982.2:543.39

ББК 48

© ФГБНУ «Омский АНЦ», 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
1. Аллергическая диагностика в неблагополучных по микобактериозам хозяйствах.....	5
2. Методы контроля микобактериальных инфекций у животных	6
2.1. Определение функционального состояния фагоцитирующих клеток.....	6
2.1.1. Определение активности миелопероксидазы	6
2.1.2. Определение катионных белков лизосом.....	7
2.1.3. Тест с нитросиним тетразолием (НСТ-тест).....	8
2.2. Реакция непрямой иммунофлюоресценции.....	9
3. Профилактика микобактериозов в благополучных по туберкулезу крупного рогатого скота хозяйствах с применением КИМ-М2(У).....	10
Заключение.....	17
Литература.....	18

Введение

В настоящее время по мере существенного улучшения эпизоотической ситуации по туберкулезу крупного рогатого скота наиболее распространенными становятся нетуберкулезные микобактерии (НТМ), имеющие широкое разнообразие групп видов и обнаруживаемые в различных природных и антропогенных средах.

Нетуберкулезные микобактерии создают ряд проблем, а именно: они существенно затрудняют проведение диагностических исследований животных на туберкулез, вызывая неспецифические реакции при тестировании внутрикожной аллергической пробой, а также могут вызывать оппортунистические инфекции, приводящие к значительным экономическим потерям.

Отсутствие надежных методов прижизненной дифференциации неспецифических реакций, обусловленных НТМ, создает необходимость поиска методов иммунотерапии для профилактики и/или лечения микобактериозов. В ряде исследований подчеркивается потенциал БЦЖ и других новых противотуберкулезных вакцин для перекрестно-протективного профилактического и иммунотерапевтического действия против наиболее значимых микобактериальных инфекций.

Вместе с тем испытание новых иммунобиологических противотуберкулезных препаратов на лабораторной модели микобактериальной инфекции требует применение методов, способных контролировать инфекционный статус.

Авторы представленного пособия надеются, что описанные методы профилактики и контроля микобактериальных инфекций найдут широкое применение как при проведении лабораторных исследований, так и в производственных условиях с целью иммунотерапии микобактериозов крупного рогатого скота, регистрируемых во многих регионах Российской Федерации.

1. Аллергическая диагностика в неблагополучных по микобактериозам хозяйствах

Сущность аллергической диагностики заключается в выявлении животных, инфицированных возбудителем туберкулеза или другими микобактериями, в пробе с туберкулином.

Внутрикожная туберкулиновая проба является одним из основных, обязательных методов исследования на туберкулез.

В благополучных по туберкулезу стадах крупного рогатого скота у животных может наблюдаться повышенная чувствительность к аллергену, обусловленная сенсibilизацией организма животных НТМ, которая по характеру проявления не отличается от реакций у животных, инфицированных возбудителем туберкулеза бычьего вида.

В таких случаях реагирующий на внутрикожное введение туберкулина для млекопитающих крупный рогатый скот в день учета реакции исследуют пальпебральной туберкулиновой пробой (введение аллергена в толщу нижнего века), на которую реагируют только животные, зараженные возбудителем бычьего или человеческого видов.

Реагирующих животных подвергают диагностическому убою с отбором патологического материала. В соответствии с приказом № 534 Минсельхоза России от 08.09.2020 года «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов туберкулеза» нереагирующих через 45 суток после проведения пальпебральной пробы необходимо подвергать исследованию симультанной пробой, заключающейся в одновременном введении двух аллергенов – ППД-туберкулина для млекопитающих и комплексного аллергена из атипичных микобактерий (КАМ) или ППД-туберкулина для птиц. В случаях если интенсивность реакции в большей степени выражена на туберкулин для млекопитающих, чем на КАМ или туберкулин для птиц, таких животных подвергают диагностическому убою с отбором проб патологического материала.

2. Методы контроля микобактериальных инфекций у животных

2.1. Определение функционального состояния фагоцитирующих клеток

Ведущую роль в формировании противотуберкулезного иммунитета играет функциональное состояние бактерицидных систем нейтрофильных гранулоцитов. Наиболее доступными и информативными методами их оценки являются исследование активности миелопероксидазы и содержания катионных белков лизосом.

Для исследований необходимо небольшое количество крови, которое от морской свинки получают путем прокола края уха иглой и с помощью стеклянной пипетки с грушей сразу же ее наносят на предметное стекло для приготовления мазка.

2.1.1. Определение активности миелопероксидазы

Метод основан на окислении бензидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы в коричневый оксибензидин.

Перед постановкой реакции готовят:

4% спирт-формалин – 10 частей 40% формалина и 90 частей 96% спирта;

инкубационный раствор – 100 мг бензидина растворяют в 12 мл 96% спирта, затем добавляют 8 мл дистиллированной воды и 0,04 мл 3% раствора перекиси водорода

краску Романовского (к 50 мл краски добавляют 200 мл дистиллированной воды).

Постановка реакции. Готовят мазки крови, высушивают. Фиксируют в 4% растворе спирт-формалина 15 секунд, тщательно промывают в дистиллированной воде и высушивают. Погружают мазки в инкубационный раствор бензидина на 5-6 минут, тщательно промывают и высушивают. Окрашивают по Романовскому.

Учет реакции. Считают не менее 100 гранулоцитов, определяя процент клеток, содержащих коричневые гранулы фермента миелопероксидазы, и в соответствии со стандартными методиками рассчитывают средний цитохимический коэффициент (СЦК).

С этой целью исследуемые клетки делят по активности гранул на 4 группы:

неактивные (0 степень) – клетки, не имеющие гранул;

малоактивные (1 степень) – фагоциты с единичными гранулами;
среднеактивные (2 степень) – клетки, у которых менее половины площади цитоплазмы занята гранулами;

высокоактивные (3 степень) – фагоциты с гранулами, занимающими более половины или всю площадь цитоплазмы.

Итоговый результат активности фагоцитов оценивают по формуле:

$$СЦК = \frac{1 \times H1 + 2 \times H2 + 3 \times H3}{100},$$

где H1, H2, H3 – количество нейтрофилов с активностью 1, 2 и 3 балла соответственно.

2.1.2. Определение катионных белков лизосом

Катионные белки гранулоцитов определяют неферментную бактерицидную активность клеток. Метод основан на способности анионных красителей (бромфенолового синего, прочного зеленого) при рН 8,1-8,2 избирательно окрашивать только катионные белки.

Перед постановкой реакции готовят:

0,05 М боратный буфер рН 8,1-8,2. К 12,4 г борной кислоты добавляют до 1 литра дистиллированной кислоты. 3,8 г тетрабората натрия доводят до 200 мл дистиллированной воды. Затем к 50 мл борной кислоты добавляют 7,3 мл тетрабората натрия. Доводят объем до 200 мл дистиллированной воды. Проверяют рН буфера на рН-метре;

0,1% раствор бромфенолового синего. Смешивают 1 г красителя и 200 мл боратного буфера. Растворяют в течение 24-х часов и хранят при температуре 2-8°C в течение нескольких месяцев;

1% раствор сафранина. 1 г сафранина растворяют в 15,5 мл 96% этанола, затем добавляют 5 мл дистиллированной воды. Хранят при 4°C в течение длительного времени. Для окрашивания мазков берут 2,5 мл раствора сафранина и смешивают в 250 мл дистиллированной воды.

Постановка реакции. Готовят мазки крови, затем свежесушенный мазок фиксируют 1-1,5 мин в 5% сульфасалициловой кислоте, тщательно промывают в дистиллированной воде и высушивают. Окрашивают мазок в 0,1% растворе бромфенолового синего в течение 1-2 мин, трижды промывают в трех сменах боратного буфера по 1-2 минуте и высушивают. Затем докрасивают в 1% растворе сафранина в течение 1 мин и вновь высушивают.

