

**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.

Учет реакции. Считают не менее 100 гранулоцитов, определяя процент клеток, содержащих синие гранулы катионных белков, и по стандартной схеме рассчитывают СЦК.

2.1.3. Тест с нитросиним тетразолием (НСТ-тест)

Метод основан на восстановлении функционально активными фагоцитами растворимого красителя – нитросинего тетразолия в нерастворимый диформазан, который фиксируется в цитоплазме и на поверхности фагоцитов (нейтрофилов) и характеризует окислительно-восстановительную активность фагоцитирующих клеток.

Реакция восстановления нитросинего тетразолия свидетельствует об интенсивности респираторного взрыва (образование супероксидного аниона кислорода), являющегося чувствительным индикатором раздражения фагоцитарных клеток (спонтанный НСТ-тест) и их функционального резерва (индуцированный НСТ-тест). Повышение активности показателей НСТ-теста свидетельствует об активации функциональной (фагоцитарной) активности нейтрофильных гранулоцитов при системных бактериальных инфекционных заболеваниях.

НСТ-тест ставят в двух вариантах: спонтанном и индуцированном (с антигеном). Спонтанный НСТ-тест отражает степень функционального раздражения нейтрофилов *in vivo*, являясь своеобразным зеркалом гомеостаза. Индуцированный НСТ-тест характеризует потенциальную способность нейтрофилов ответить «респираторным взрывом» на адекватное раздражение. Отношение показателей индуцированного НСТ к спонтанному тесту рассматривают как биохимический критерий готовности нейтрофила к завершённому фагоцитозу (полному уничтожению объекта) и называют функциональным резервом.

Постановка реакции. В две параллельные лунки полимерного планшета для иммунологических реакций вносят по 20 мкл гепаринизированной крови и оценивают функциональное состояние нейтрофилов по уровням спонтанной и стимулированной активности. Затем в одну лунку добавляют 20 мкл смеси равных объемов 0,1 %-ного НСТ на изотоническом растворе (спонтанный вариант), во вторую лунку добавляют 20 мкл смеси равных объемов 0,1 %-ного НСТ и предварительно растворенную в изотоническом растворе NaCl (1000 мкг/мл) вакцину БЦЖ (стимулированный вариант). После внесения всех реагентов планшет с пробами инкубируют 30 минут при 37°C,

затем для гемолиза эритроцитов вносят в каждую лунку по 160 мкл 3%-ной уксусной кислоты, таким образом, получая десятикратное разведение крови.

Учет реакции. Заправляют пробу в камеру Горяева (объектив х 40), подсчитывают 100-200 нейтрофилов, определяют процент положительно реагирующих НСТ-клеток. В цитоплазме клеток, положительно реагирующих с НСТ, отмечается отложение гранул формазана фиолетово-синего цвета. В цитоплазме клеток, отрицательно реагирующих с НСТ, гранулы формазана отсутствуют.

2.2. Реакция непрямой иммунофлюоресценции

Метод выявляет комплекс антиген-антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченной флюорохромом. Для этого мазки с антигеном инфекционного агента обрабатывают антителами диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся с антигенами инфекционного агента, отмывают, а связавшиеся антиген-антительный комплекс выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой сывороткой, меченной флюорохромами. В результате образуется комплекс антиген инфекционного агента + антитела диагностической сыворотки + антиглобулиновые антитела, меченные флюорохромом. Этот светящийся комплекс наблюдают в ультрафиолетовых лучах люминесцентного микроскопа в виде яркого свечения зеленого цвета.

Постановка реакции. На чистые, без царапин и трещин, обезжиренные предметные стекла подогретые до 25°C наносят каплю свежей или стабилизированной крови на край стекла, затем растирают каплю по стеклу с помощью чистого шлифовального стекла, помещая его под углом 45°, коротким ребром подождав пока вся кровь расплывется под ним. Быстрым движением от капли проводят по предметному стеклу. Получают тонкие мазки, которые подписывают, регистрируют в журнале, высушивают на воздухе и фиксируют 30 минут в фиксирующих жидкостях (спирт 96⁰, жидкость Никифорова, ацетон и т.д.). Стекла подсушивают.

Исследуемый мазок можно разделить на три части для контроля реакции слева на право наносим полуавтоматическим одноканальным дозатором по 50 мкл: сыворотка положительная, сыворотка отрицательная, физиологический раствор, затем стекла выдерживают во

влажной камере в термостате при 37-38°C, в течение 30 минут для образования комплекса антиген-антитело.

После чего трижды промывают дистиллированной водой от не связавшихся антител, подсушивают и наносят в красящем титре люминесцирующую сыворотку против глобулинов быка.

Затем стекла снова помещают во влажную камеру в термостат при температуре 37-38°C на 15-20 минут. По истечении этого времени мазки трижды промывают дистиллированной водой, просушивают и просматривают в люминесцентном микроскопе, с обязательными контролями реакции.

Испытуемая проба + сыворотка отрицательная + сыворотка люминесцентная;

Испытуемая проба + физиологический раствор + сыворотка люминесцентная;

Антиген + сыворотка положительная + сыворотка люминесцентная;

Антиген + сыворотка отрицательная + сыворотка люминесцентная;

Антиген + физиологический раствор + сыворотка люминесцентная.

Антигеном для контроля реакции являются инактивированные микобактерии, используемые в опыте для заражения морских свинок.

Учет реакции. Для оценки интенсивности свечения используют четырех крестовую систему:

(++++) – очень яркая люминесценция, четко контрастирующая на темном фоне;

(+++) – яркая люминесценция;

(++) или (+) – слабое свечение;

(-) – отсутствие люминесценции.

Сомнительные результаты оценивают в два креста при наличии слабого свечения. При отрицательной реакции следует просматривать мазок в 30 полях поля зрения микроскопа.

3. Профилактика микобактериозов в благополучных по туберкулезу с применением КИМ-М2(У)

Для получения специфического иммуномодулятора культуру вакцинного штамма БЦЖ, выращенную на жидкой синтетической среде Сотона, подвергают ультразвуковой дезинтеграции на аппарате УЗДН-1 в течение 30 мин. Полученную взвесь центрифугируют, в надосадочной жидкости, после ее предварительной инкубации с формалином, определяют содержание белка с помощью красителя бромфенолового синего. Для иммунизации животных используют конъюгаты, в состав которых входят антигены БЦЖ в комплексе с поливинилпирролидоном (ПВП) и полиэтиленгликолем (ПЭГ) в соотношении 1:400. Концентрацию белка в антигенном комплексе доводят до 1 мг/мл, затем в препарат добавляют ПВП в количестве 320 мг, ПЭГ – 80 мг и размешивают до полного растворения при комнатной температуре.

Специфический иммуномодулятор применяют на крупном рогатом скоте в благополучных по туберкулезу и неблагополучных по микобактериозам (парааллергические туберкулиновые реакции) хозяйствах (фермах).

КИМ-М2(У) применяют на всех возрастных группах с 10-20-суточного возраста 2 раза в год через 6 месяцев на молодняке и один раз в год на коровах после исследования ППД-туберкулиновой пробой. Препарат вводят подкожно в шею на расстоянии 8-10 см от переднего края лопатки. Перед введением препарата поверхность кожи дезинфицируют 70 %-ным этиловым спиртом. Для введения используют шприцы емкостью 5-10 мл и стерильные иглы для подкожного введения. Доза препарата на одного животного составляет: молодняку до 4-х месяцев 1,0-1,5 мг белка; в возрасте до года 1,5-3 мг белка; в возрасте старше года 3-5 мг белка; коровам 5-7 мг белка.

Следует избегать нарушения схемы (сроков) введения иммуномодулятора, поскольку это может привести к снижению эффективности иммунопрофилактики и иммунотерапии микобактериозов. В случае пропуска очередного введения препарата необходимо провести иммунизацию как можно скорее.

Запрещается использовать препарат совместно с другими иммунобиологическими и антибактериальными препаратами, а также при-

вивать животных вакцинами (сибирской язвы, бруцеллеза, ящура) за 2 недели до и после вакцинации.

При работе с препаратом следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с иммунобиологическими лекарственными средствами ветеринарного назначения.

Пример 1. Для эксперимента было отобрано 40 морских свинок, из которых сформировали 8 групп. Пять интактных особей (группа 1) служили негативным контролем, другие 5 – позитивным контролем (группа 2), которым подкожно вводили *M. bovis* (шт. 14) в дозе 1 мкг/мл. Животным 3-й группы (n=5) – подкожно вводили *M. phlei* в дозе 5 мг, 4-й группы (n=5) подкожно вводили *M. phlei* в дозе 5 мг, через 14 суток КИМ-М2 в дозе 500 мкг/мл белка, 5-й группы (n=5) – подкожно вводили *M. scrofulaceum* в дозе 5 мг, 6-й группы (n=5) – подкожно вводили *M. scrofulaceum* в дозе 5 мг, через 14 суток КИМ-М2 в дозе 500 мкг/мл белка, 7-й группы (n=5) – подкожно вводили *M. smegmatis* в дозе 5 мг, 8-й группы (n=5) – подкожно вводили *M. smegmatis* в дозе 5 мг, через 14 суток КИМ-М2 в дозе 500 мкг/мл белка.

С целью оценки выявления антигена с помощью РНИФ производили отбор периферической крови морских свинок всех групп на 3-, 7-, 21-, 28-е и 42-е сутки от начала эксперимента. На 21-, 28- и 42-е сутки после экспериментального заражения у животных всех групп также производили цитохимическую оценку функционального состояния нейтрофилов путем определения активности миелопероксидазы и содержания катионных белков с последующим вычислением среднего цитохимического коэффициента (СЦК).

Анализ результатов аллергических и серологических исследований. Результаты исследований показали, что на 21-е сутки после инфицирования НТМ у морских свинок на введение ППД-туберкулина развивается аллергическая реакция. Так, при сенсibilизации *M. phlei* и *M. smegmatis* реагировали 100% особей, тогда как в группе инфицированных *M. scrofulaceum* кожная припухлость отсутствовала только у одной особи.

У животных 4-й, 6-й и 8-й групп, которым на 14-е сутки после инокуляции НТМ был введен специфический иммуномодулятор КИМ-М2, состояния повышенной чувствительности замедленного типа (ПЧЗТ) не регистрировали. Исключением являлась одна морская

свинка, инфицированная *M. smegmatis* (8-я группа). Следует отметить, что заражение этим видом НТМ индуцировало самую высокую сенсибилизирующую способность, о чем свидетельствовала наиболее интенсивная аллергическая реакция у животных 7-й группы, развивающаяся на введение ППД-туберкулина – $7,2 \pm 0,37$ мм.

Результаты аллергических исследований подтверждались реакцией непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ). Так, в мазках крови морских свинок всех опытных групп на 3- и 7-е сутки после сенсибилизации НТМ регистрировали антиген с помощью гомологичных сывороток, полученных от зараженных животных (табл. 1).

Таблица 1

Диагностические исследования мазков крови иммунофлуоресцентным методом у морских свинок контрольных и опытных групп, %

Наименование штамма	Сенсибилизированные НТМ (n=5)				Сенсибилизированные НТМ за 14 суток до введения КИМ-М2 (n=5)		
	Сроки исследований (сутки)						
	3, 7	21	28	42	21	28	42
<i>M. phlei</i>	100*	100	0	0	40	0	0
<i>M. scrofulaceum</i>	100*	100	20	20	0	0	0
<i>M. smegmatis</i>	100*	100	100	60	60	0	0
Контроль негативный	0	0	0	0	0	0	0
Контроль позитивный	100	100	100	100	н/и	н/и	н/и

Примечание: *исследованию подвергнуто 10 морских свинок;
н/и – не исследовали.

На 21-е сутки после инокуляции инфекта положительный результат РНИФ был зафиксирован в группах животных, которые не подвергались обработке КИМ-М2. Несмотря на отсутствие кожной припухлости на введение аллергена, у 3-х особей (60%) инфицированных *M. smegmatis*, в т. ч. у одной, имевшей, как уже было отмечено выше, положительную аллергическую реакцию на введение ППД-туберкулина, а также у двух (40%), сенсибилизированных *M. phlei*, в мазках выявлено специфическое свечение.

У морских свинок, не иммунизированных КИМ-М2, позитивный результат РНИФ на 28-е сутки после введения *M. smegmatis* сохранялся у 100% особей, *M. scrofulaceum* – у 20% и отсутствовал у инфицированных *M. phlei*. В то же время у всех животных, подвергнутых обработке иммуномодулятором, микобактериозный антиген в мазках крови не был выявлен. Аналогичная картина наблюдалась и на 42-е сутки, лишь с той разницей, что только 60% особей, сенсibilизированных *M. smegmatis*, имели положительную РНИФ.

Анализ результатов оценки функционального состояния нейтрофилов. На 21-е сутки после инокуляции морским свинкам микобактерий наиболее выраженное увеличение активности катионных белков нейтрофилов наблюдали в группе инфицированных *M. scrofulaceum* и *M. smegmatis*, у которых этот показатель по отношению к контрольной группе возрос соответственно в 1,54 и 1,56 раза ($p < 0,01$). В группах особей, обработанных КИМ-М2 через 14 суток после их сенсibilизации НТМ, также была зафиксирована повышенная активность катионных белков. Особенно можно выделить животных, инфицированных *M. phlei*, введение которым иммуномодулятора способствовало более выраженному увеличению содержания антимикробных пептидов. Противоположная картина наблюдалась у морских свинок, зараженных *M. smegmatis*. Активность катионных белков в этой группе животных хотя и была выше по сравнению с контролем, но все же заметно снизилась после введения препарата КИМ-М2.

На 28-е сутки после инокуляции НТМ во всех опытных группах животных относительно контроля вне зависимости от того, подвергали особей обработке иммуномодулятором или нет, наблюдалось существенное усиление функциональной активности фагоцитов. В то же время введение морским свинкам вирулентной культуры *M. bovis* хотя и способствовало некоторой тенденции к увеличению числа катионных белков, но всё же не достигало статистически достоверной разницы.

К следующему сроку исследований у животных, сенсibilизированных *M. phlei* и не подвергнутых обработке препаратом КИМ-М2, число катионных белков в гранулах нейтрофилов снижалось до уровня интактных морских свинок, что связано с элиминацией микобактерий из организма. В то же время иммунизированные особи имели более высокий уровень антимикробных пептидов.

Схожая картина наблюдалась при инокуляции животным *M. scrofulaceum*.

Морские свинки, инфицированные *M. smegmatis*, в отличие от остальных групп, которым были введены НТМ, в этот срок исследования обладали высокой активностью антимикробных пептидов, о чем свидетельствовало достоверное повышение их уровня в 1,32 и 1,59 раза ($p < 0,05$) соответственно в 5-й и 6-й группах против контроля.

В группе морских свинок, инфицированных *M. bovis*, наблюдалось недостоверное снижение общей величины катионных белков, что свидетельствовало о подавлении защитной реакции фагоцитов.

Во всех без исключения группах на 21-е сутки после инокуляции нетуберкулёзных и патогенных микобактерии обнаруживалось достоверное усиление ферментной активности нейтрофильных гранулоцитов (табл. 2). Следует отметить, что после сенсibilизации *M. phlei* и *M. scrofulaceum* цитохимические параметры были на одинаково высоком уровне независимо от применения иммуномодулятора. В то же время иммунизация КИМ-М2 морских свинок 8-й группы способствовала некоторой тенденции к снижению ферментной деятельности миелопероксидазы относительно животных 7-й группы.

Таблица 2

Активность миелопероксидазы в нейтрофильных гранулоцитах морских свинок после сенсibilизации нетуберкулезными и патогенными микобактериями и введения иммуномодулятора КИМ-М2, $M \pm m$

Группа животных (штамм, обработка иммуномодулятором)	Миелопероксидаза (СЦК), у.е.		
	Сроки исследований после инфицирования НТМ (после введения КИМ-М2), сут		
	21 (7)	28 (14)	42 (28)
1-я (контроль)	1,04±0,03	1,22±0,09	1,26±0,02
2-я (<i>M. bovis</i>)	1,50±0,07**	1,29±0,03	0,93±0,07*
3-я (<i>M. phlei</i>)	1,55±0,15*	1,66±0,05*	1,19±0,05
4-я (<i>M. phlei</i> , КИМ-М2)	1,64±0,15*	1,42±0,07	1,57±0,21
5-я (<i>M. scrofulaceum</i>)	2,09±0,03***	1,70±0,03**	1,37±0,07
6-я (<i>M. scrofulaceum</i> , КИМ-М2)	1,92±0,03***	1,82±0,17*	1,59±0,14
7-я (<i>M. smegmatis</i>)	1,95±0,05***	1,51±0,04*	1,45±0,05*
8-я (<i>M. smegmatis</i> , КИМ-М2)	1,58±0,09**	1,83±0,05**	1,59±0,09*

Примечание: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

На 28-е сутки от начала эксперимента активность миелопероксидазы в фагоцитах также была на достоверно высоком уровне у особей, сенсibilизированных НТМ, при этом введение иммуномодулятора особям, инфицированным *M. scrofulaceum* и *M. smegmatis*, усиливало эффективность кислород-зависимой бактерицидной системы. В то же время инокуляция патогенных микобактерий индуцировала снижение уровня миелопероксидазы в нейтрофилах до уровня животных контрольной группы.

Как и при анализе содержания катионных белков, на 42-е сутки исследования регистрировалось статистически значимое увеличение активности миелопероксидазы только у морских свинок, инфицированных *M. smegmatis*. Так, в 7-й группе этот цитохимический параметр возрос в 1,15 раза ($p < 0,05$), а в 8-й – в 1,26 раза ($p < 0,05$). В этот же срок исследования происходило резкое снижение ферментной биоцидной эффективности у животных, которым была введена вирулентная культура *M. bovis*, относительно контроля.

Уровень миелопероксидазы в гранулах нейтрофилов практически не отличался от контрольной группы при инфицировании морских свинок *M. phlei* и имел незначительную тенденцию к возрастанию при сенсibilизации *M. scrofulaceum*, но при введении иммуномодулятора был выше. Отмеченная закономерность, как было показано ранее, выявлена нами при исследовании анаэробной биоцидной системы фагоцитов, что указывает на тесное взаимодействие разных механизмов уничтожения патогенов.

Такого рода изменения свидетельствуют о том, что у морских свинок, инфицированных *M. smegmatis*, к 42-му дню эксперимента не произошло полной элиминации микобактерий из организма, поэтому активность бактерицидных систем продолжала оставаться на более высоком уровне. В то же время стимуляция иммунной функции нейтрофилов с помощью препарата КИМ-М2 способствует более быстрому уничтожению патогена. Этот факт подтверждают серологические исследования, в которых отмечено, что у 60% морских свинок на 42-е сутки после инфицирования обнаружен микобактериозный антиген в мазках крови с помощью реакции непрямой иммунофлуоресценции. У иммунизированных КИМ-М2 в этот срок исследования антиген отсутствовал.

Пример 2. В благополучном по туберкулезу крупного рогатого скота хозяйстве, в котором при плановых обследованиях на туберку-

лез регулярно выявляют положительные аллергические реакции на внутрикожное введение диагностического ППД-туберкулина, а при бактериологическом исследовании биоматериала от реагирующих коров выделяют НТМ II-IV групп по Раньону, были отобраны 20 голов: 10 не реагирующих на введение ППД-туберкулина для млекопитающих (1-я группа, контроль) и 10 коров, реагирующих на внутрикожное введение ППД-туберкулина, но, имеющих отрицательную реакцию на пальпебральное введение аллергена (2-я группа). Всем животным, реагирующим на ППД-туберкулин (2-я группа), ввели иммуномодулятор подкожно в дозе 5-7 мг белка на животное. Через 45 суток после введения препарата было проведено аллергическое исследование ППД-туберкулином, в результате которого было установлено отсутствие реагирующих животных как в контрольной, так и в опытной группах.

Заключение

В настоящее время возрастает значимость специфической защиты крупного рогатого скота от микобактериозов. Поэтому применение специфического иммуномодулятора КИМ-М2, отличающегося экологической безопасностью и одновременно довольно высокой иммуногенностью позволит, по нашему мнению, успешно проводить профилактические мероприятия.

Контроль за инфекционным статусом животных можно с достаточно высокой эффективностью можно осуществлять с помощью реакции непрямой иммунофлуоресценции, позволяющей произвести прямое определение наличия микобактерий в крови, а также применением методов оценки функционального состояния бактерицидных систем нейтрофилов.

Литература

1. Донченко, А.С. Диагностика туберкулёза у крупного рогатого скота / А.С. Донченко, Н.П. Овдиенко, Н.А. Донченко. – Новосибирск, 2004.-309 с.

2. Найманов, А.Х. Пальпебральная туберкулиновая проба в целях дифференциации неспецифических реакций на туберкулин / А.Х. Найманов, Н.П. Овдиенко, Н.П. Помыканов [и др.] // Актуальные проблемы ветеринарной медицины продуктивных и непродуктивных животных: сб. науч. тр. 5-й межрег. науч.-практ. конф / СО РАСХН, ВНИИБТЖ. - Омск, 2006. – С. 165-170.

3. Приказ Минсельхоза России от 08.09.2020 N 534 «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».

4. Патент РФ № 2283134, А61К 39/04 (2006.01). Способ профилактики парааллергических реакций у животных в благополучных по туберкулезу хозяйствах/ Кощеев Н.Н., Ощепков В.Г., Смолянинов Ю.И., Бажин М.А., Куварин А.С.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА, ПРОФИЛАКТИКА
И КОНТРОЛЬ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ
У ЖИВОТНЫХ

Н.А. Денгис, Е.А. Кособоков, В.С. Власенко, Н.Н. Новикова

Методические рекомендации

Подписано в печать 17.04.2023. Формат 60\84\16

Бумага офсетная. Печать оперативная.

Печ. л 1,25. Гарнитура «Times New Roman»

Тираж 50 экз.

Отпечатано в типографии ИП Макшеевой Е.А.

г. Омск, ул. Долгирева, 126, тел.: 89083194462