

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Омский аграрный научный центр»

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
НЕЙТРОФИЛОВ У ЖИВОТНЫХ,
СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ БРУЦЕЛЛАМИ**

Методические рекомендации

Омск 2025

УДК 619:616.981.42

ББК 48.73

М-545

Рецензенты:

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

Аракелян П.К. – заведующий научно-производственной лабораторией диагностики и профилактики бруцеллеза ГКУ СК «Ставропольская краевая СББЖ», доктор ветеринарных наук, профессор.

М-545 Методы оценки функциональной активности нейтрофилов у животных, сенсибилизованных бруцеллами: методические рекомендации / Омский АНЦ; сост.: О.О. Манакова, Т.А. Янченко, В.С. Власенко. – Омск: ФГБНУ «Омский АНЦ», 2025. – 24 с.

ISBN 978-5-98559-060-9

Описаны методы оценки функциональной активности нейтрофилов, позволяющие объективно оценивать клеточную перестройку организма животных при сенсибилизации бруцеллами.

Предназначены для специалистов ветеринарных научно-исследовательских институтов, научных и производственных лабораторий, преподавателей и студентов образовательных учреждений.

*Утверждены на заседании Ученого совета
ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»
(протокол № 4 от 10.07.2025г.)*

ISBN 978-5-98559-060-9

УДК 619:616.981.42

ББК 48.73

ГБНУ «Омский АНЦ», 2025

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
1. Определение общей окислительно-восстановительной активности нейтрофилов в teste восстановления нитросинего тетразолия	5
1.1. Оборудование и реактивы	6
1.2. Постановка реакции	6
1.3. Учет реакции	8
2. Определение активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках	8
2.1. Оборудование и реактивы	8
2.2. Постановка реакции	9
2.3. Учет реакции	10
3. Определение количества катионных белков в фагоцитирующих клетках	10
3.1. Оборудование и реактивы	10
3.2. Постановка реакции	11
3.3. Учет реакции	11
4. Оценка иммунологического статуса животных при сенсибилизации бруцеллами	11
Заключение	22
Список литературы	22

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на применяемую в животноводстве систему противобруцеллезных мероприятий, бруцеллез крупного и мелкого рогатого скота широко распространен на территории Российской Федерации и остается эндемичным во многих субъектах, представляя опасность, при несвоевременном выявлении и нарушении противобруцеллезных мероприятий, перезаражения животных и людей не только на животноводческих предприятиях, где обнаружен бруцеллез, но и для приграничных регионов [1, 2].

Устойчивость макроорганизма к патогенным микроорганизмам рода *Brucella* на первых этапах развития инфекционного процесса определяется активностью клеточных факторов защиты, а именно активацией бактерицидных механизмов фагоцитов. Основными фагоцитирующими клетками, осуществляющими противобруцеллезную защиту, являются полиморфноядерные нейтрофилы. Функционально-метаболический статус нейтрофилов определяет выраженность воспалительной реакции, развивающейся в ответ на проникновение в организм инфекционных возбудителей. Бактерицидные свойства нейтрофилов обеспечиваются гидролитическими ферментами, катионными белками, активными формами кислорода. Основными путями реализации бактерицидной функции нейтрофилов являются кислород-зависимый и кислород-независимый метаболизм [3, 4].

Кислород-зависимый метаболизм реализуется посредством кислородного взрыва, а также при участии активных форм кислорода. При поглощении и переваривании бактерий увеличивается потребление кислорода, вызывая респираторный взрыв. При этом образуются активные формы кислорода, которые обладают противомикробным действием.

Одним из наиболее объективных методов исследования кислородного взрыва является тест с нитросиним тетразолием, который основан на способности гранулоцитов фагоцитировать бесцветный краситель тетразолиевого ряда – НСТ и затем восстанавливать его в нерастворимый формазан темно-синего цвета с помощью НАД Н- и НАДФ Н-оксидаз [5, 6].

Гранулярный аппарат нейтрофилов млекопитающих содержит целый ряд белков, выполняющих antimикробную функцию. Одним из основных ферментов antimикробной защиты нейтрофила является миелопероксидаза.

Миелопероксидаза играет важную роль во врожденном иммунитете для защиты от микроорганизмов у многих видов животных и представляет собой лизосомальный фермент пероксидазу, который в основном хранится в азурофильтальных гранулах нейтрофилов и секretируется при их активации. Активность миелопероксидазы нейтрофилов служит маркером интенсивности воспалительных процессов, а также является перспективным диагностическим и прогностическим показателем при ряде инфекционных заболеваний и патологических состояний [7].

Кислород-независимый метаболизм осуществляется при участии лизоцима, катионных белков и гидролитических ферментов, среди которых особое место принадлежит катионным белкам. Катионные белки принимают участие в иммунологических процессах, определяют взаимосвязь в развитии клеточных и гуморальных факторов иммунитета, а также в формировании неспецифического и специфического звена резистентности, обеспечивая иммунный гомеостаз [8, 9].

Исследования ферментативных и неферментативных систем нейтрофилов представляет большой интерес для диагностики инфекционных заболеваний у многих видов животных, так как позволяют обнаружить изменения в организме на ранних стадиях развития инфекционного процесса, до появления более глубоких изменений в органах и системах, выявляемых с помощью традиционных методов исследований.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ В ТЕСТЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НИТРОСИНЕГО ТЕТРАЗОЛИЯ

Метод основан на восстановлении функционально активными нейтрофилами 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 и их функционального резерва.

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-теста к спонтанному тесту рассматривают как биохимический критерий готовности нейтрофила к завершенному фагоцитозу (полному уничтожению объекта) и называют функциональным резервом.

1.1. Оборудование и реактивы

Многоканальный иммунохимический анализатор;

Планшет для иммуноферментного анализа, полистероловый 96-луночный, плоскодонный;

Автоматические дозаторы с регулируемым объемом от 10 до 1000 мкл;

Термостат;

Баня лабораторная на 60°C;

Центрифуга планшетная;

Фиколл-урографин $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ и $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$;

Нитросиний тетразолий 0,15% (М 817,63);

Забуференный физиологический раствор (рН 7,2) или изотонический раствор NaCl (ЗФР);

Димексид (диметилсульфоксид) – медицинский;

Раствор KOH 2M (готовится из чистого концентратса);

Бруцеллезный антиген;

Абсолютный этиловый или метиловый спирт.

1.2. Постановка реакции

Приготовление смеси фиколл-урографина. Из 76 или 60 %-ного урографина с помощью дистиллированной воды получают 17 %-ный раствор, доводя плотность до 1,092 г/см³. В теплой дистиллированной воде готовят 9 %-ный раствор фиколла – 400 и 34 %-ный раствор урографина. Затем смешивают их в соотношении 12:5 соответственно и доводят плотность до 1,077 г/см³. Для приготовления смеси фиколл-урографина плотностью 1,119 г/см³ смешивают 50 %-ный раствор урографина и 9 %-ный раствор фиколла 400 в соотношении 10:5.

Выделение лимфоцитов. Выделяют лимфоциты центрифугированием в двойном градиенте плотности. С этой целью

используют смесь фиколл-урографина $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ и $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$. Вначале создают двойной градиент фиколл-урографина: первым в пробирку вносят раствор фиколл-урографина, имеющий плотность $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$, затем на него аккуратно наслаживают раствор с плотностью $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$. Гепаринизированную кровь наслаживают на двойной градиент фиколл-урографина, центрифугируют 45 минут при 400 g. После центрифугирования получают кольца мононуклеарных клеток (верхнее) и нейтрофилов (нижнее), а в осадке находятся эритроциты. Нейтрофильное кольцо отбирают и переносят в чистую пробирку, затем клетки дважды отмывают, центрифугируя 10 мин при 200 об/мин.

Для подсчета разведения лимфоцитов в 0,38 мл 3% уксусной кислоты вносят 0,02 мл взвеси лимфоцитов. Подсчитывают в камере Горяева в 5 больших квадратах, разделенных на 4, по диагонали. Полученную сумму делим на 8. Результат равен количеству мл раствора Хенкса, необходимого для разведения осадка лимфоцитов, чтобы получить концентрацию 2-3 тыс/мкл. Данный коэффициент выведен из расчета, что при концентрации 2-3 тыс/мкл в среднем должно содержаться 8 клеток в 1 большом квадрате.

Приготовление 0,15%-ного раствора нитросинего тетразолия. 10 мг НСТ разводят в 1,875 мл дистиллированной воды, добавляют 7 мл 0,85%-ного раствора NaCl.

Клеточную взвесь вносят по 100 мкл в две параллельные лунки 96-луночного плоскодонного планшета для иммуноферментного анализа. В одну лунку планшета добавляют 50 мкл ЗФР (спонтанный НСТ-тест), а в другую - 50 мкл стимулятора (брюцеллезного антигена) в оптимальном разведении в ЗФР (индукционный НСТ-тест). Затем в обе лунки планшета добавляют по 50 мкл 0,15%-ного раствора нитросинего тетразолия и осторожно перемешивают содержимое лунок, после чего планшеты с ингредиентами инкубируют 20 минут при температуре 37°C.

Затем для остановки реакции восстановления НСТ и осаждения клеток, содержащих темно-синий диформазан, планшет с пробами центрифугируют 10 минут при 500 об/мин. Далее для фиксации осажденных клеток, отделяют надосадок, добавляют 200 мкл абсолютного этилового спирта и центрифугируют 5 мин при 500 об/мин.

После центрифугирования надосадочную жидкость отделяют и для отмывания клеточного осадка добавляют 200 мкл 0,85%-ного

раствора NaCl, центрифугируют 5 мин при 500 об/мин. Для растворения, образовавшегося диформазана, добавляют в каждую лунку 130 мкл димексида и инкубируют в его присутствии на водяной бане при 60°C в течение 20 мин. Для визуализации реакции после инкубации в лунки добавляют по 70 мкл 2М раствора KOH и тщательным перемешиванием добиваются равномерного окрашивания раствора.

1.3. Учет реакции

Результат реакции регистрируют на многоканальном иммунохимическом планшетном анализаторе при длине волны 492 нм и выражают в условных единицах оптической плотности (у.е.оп.пл.). После учета реакции определяют коэффициент по формуле:

$$KC = \frac{\text{Индукционный НСТ} - \text{тест}}{\text{Спонтанный НСТ} - \text{тест}}$$

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ В ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ

Метод позволяет судить о кислородзависимой бактерицидной активности фагоцитов. Система миелопероксидазы является одной из самых мощных бактерицидных систем фагоцитирующей клетки. При участии миелопероксидазы происходит образование таких бактерицидных агентов, как перекись водорода, гипохлорная кислота и другие. Активность миелопероксидазы может изменяться при активации клетки как за счет потери фермента при секреторной дегрануляции, так и за счет связывания субстрата с коферментом и образования новых активных форм фермента. Определение активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках является одним из наиболее существенных тестов, позволяющих судить о бактерицидной активности фагоцитов. Изменение активности фермента при стимуляции клетки может косвенно свидетельствовать о способности клетки к дегрануляции и возможностям компенсировать потери миелопероксидазы за счет внутриклеточного новообразования фермента.

2.1. Оборудование и реагенты

Многоканальный иммунохимический анализатор;

Планшет для иммуноферментного анализа, полистероловый 96-луночный, плоскодонный;

Автоматические дозаторы с регулируемым объемом от 10 до 1000 мкл;

Термостат;

Центрифуга планшетная;

Забуференный физиологический раствор (рН 7,2) или изотонический раствор NaCl (ЗФР);

Фосфатно-цитратный буфер (рН 5,0);

Ортофенилендиамина 0,04%;

Перекись водорода (H_2O_2) 0,33 %;

Серная кислота (H_2SO_4) 10%;

Бруцеллезный антиген.

2.2. Постановка реакции

Приготовление фосфатно-цитратного буфера.

Раствор № 1 – Кислота лимонная 0,1М - 21,014 г лимонной кислоты растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 1 литра.

Раствор № 2 – Натрий фосфорнокислый двузамещенный 0,2М - 35,6 г натрия фосфорнокислого двузамещенного растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 1 литра.

Для приготовления фосфатно-цитратного буфера с рН 5,0 смешивают 51,5 мл раствора № 2 с 48,5 мл раствора № 1.

Приготовление субстратной смеси.

К 10 мл фосфатно-цитратного буфера добавляют 4 мг ортофенилендиамина и 500 мкл 0,33% перекиси водорода.

Гепаринизированную кровь вносят по 50 мкл в две параллельные лунки 96-луночного плоскодонного планшета для иммуноферментного анализа. В одну лунку планшета добавляют 20 мкл ЗФР или физиологического раствора (спонтанная продукция миелопероксидазы), а в другую - 20 мкл стимулятора (бруцеллезный антиген) (индуцированная продукция миелопероксидазы) и осторожно перемешивают. Планшет инкубируют в термостате при 37°C в течение 60 мин. Для осаждения клеток планшет с пробами центрифугируют 10 минут при 500 об/мин, отделяют надосадок. Затем клетки троекратно отмывают в 200 мкл ЗФР или физиологического раствора путем центрифугирования при 500 об/мин в течение 5 минут, отделяют надосадок. Вносят 100 мкл субстратной смеси на лунку, инкубируют 10 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливают добавлением 100 мкл 10% серной кислоты.

2.3. Учет реакции

Результат реакции регистрируют на многоканальном иммунохимическом планшетном анализаторе при длине волны 492 нм и выражают в условных единицах оптической плотности (у.е.оп.пл.). После учета реакции определяют коэффициент стимуляции по формуле:

$$КС = \frac{\text{Индукционная продукция миелопероксидазы}}{\text{Спонтанная продукция миелопероксидазы}}$$

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА КАТИОННЫХ БЕЛКОВ В ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ

Неферментные катионные белки являются бактерицидной системой фагоцитирующей клетки, способной к уничтожению поглощенных бактерицидных агентов и экстрацеллюлярному киллингу. Снижение количества катионных белков в клетках происходит при различных хронических и острых бактериальных инфекциях.

Метод определения катионных белков основан на способности анионных красителей (бромфенолового синего, прочного зелёного) при рН 8,1–8,2 избирательно окрашивать только катионные белки. Подсчет количества катионных белков в фагоцитирующей клетке определяют с помощью спектрофотометрического анализа.

3.1. Оборудование и реактивы

Многоканальный иммунохимический анализатор;

Планшет для иммуноферментного анализа, полистероловый 96-луночный, плоскодонный;

Автоматические дозаторы с регулируемым объемом от 10 до 1000 мкл;

Термостат;

Центрифуга планшетная;

Забуференный физиологический раствор (рН 7,2) или изотонический раствор NaCl (ЗФР);

Димексид (диметилсульфоксид) – медицинский;

Этиловый спирт 96%;

Бромфеноловый синий 0,1 %;

Боратный буфер;

Бруцеллезных антиген.

3.2. Постановка реакции

Приготовление 0,1% бромфенолового синего.

Смешивают 1 г красителя и 200 мл боратного буфера. Растворяют в течении 24 часов при температуре 22-24 °C, фильтруют через бумажный фильтр и хранят при температуре 2-4°C до 6 месяцев.

Гепаринизированную кровь вносят по 50 мкл в две параллельные лунки 96-луночного плоскодонного планшета для иммуноферментного анализа. В одну лунку планшета добавляют 20 мкл ЗФР (спонтанная продукция катионных белков), а в другую - 20 мкл стимулятора (брузеллезный антиген) (индуцированная продукция катионных белков) и осторожно перемешивают. Планшет инкубируют 60 минут при 37°C. Для осаждения клеток планшет с пробами центрифугируют 10 минут при 500 об/мин, отделяют надосадок. Затем клетки троекратно отмывают в 200 мкл ЗФР путем центрифугирования 5 минут при 500 об/мин, отделяют надосадок. Клетки фиксируют 96% этиловым спиртом 100 мкл на лунку в течение 30 минут, надосадок удаляют, планшет высушивают на воздухе и окрашивают бромфеноловым синим – 100 мкл на лунку в течение 30 минут в термостате при 37°C. Краску удаляют, клетки троекратно отмывают в 200 мкл ЗФР путем центрифугирования при 500 об/мин в течение 5 минут, отделяют надосадок. Добавляют 200 мкл димексида и инкубируют в его присутствии в течение 10 минут при комнатной температуре, тщательно перемешивают.

3.3. Учет реакции

Результат реакции регистрируют на многоканальном иммунохимическом планшетном анализаторе при длине волны 492 нм и выражают в условных единицах оптической плотности (у.е.оп.пл.). После учета реакции определяют коэффициент по формуле:

$$КС = \frac{\text{Индуцированная продукция катионных белков}}{\text{Спонтанная продукция катионных белков}}$$

4. ОЦЕНКА ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ЖИВОТНЫХ ПРИ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ БРУЦЕЛЛАМИ

Учитывая ведущую роль клеточного иммунитета в формировании иммунологической защиты от бруцеллеза, динамика показателей функциональной активности нейтрофилов, в ответ на антигенную стимуляцию, позволит оценить некоторые особенности

иммунного ответа, при развитии воспалительного процесса у животных, сенсибилизованных бруцеллами.

Пример 1. Для сравнительного изучения динамики показателей функциональной активности нейтрофилов периферической крови в разные сроки после сенсибилизации был проведен эксперимент на 20 морских свинках. Животных опытной группы ($n=10$) иммунизировали подкожно *R*-штаммом *Brucella abortus* в дозе 1 млрд. КОЕ/мл; контрольной группе ввели 1 мл стерильного физиологического раствора. Отбор проб крови проводили до иммунизации и на 7, 14, 21, 28, 35, 42, 55, 69, 125-е сутки после иммунизации.

В качестве антигена при определении стимулированной активности *in vitro* использовали бруцеллезный антиген – ультразвуковой лизат *B. abortus*.

Также исследовали сыворотку крови в реакции агглютинации (РА) и реакции связывания комплемента (РСК) в соответствии с ГОСТ 34105-2023 «Животные. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Серологические методы».

Определение общей окислительно-восстановительной активности нейтрофилов в НСТ-тесте. Установлено, что у контрольной группы животных в разные сроки исследования показатели спонтанной и индуцированной НСТ-активности существенно не изменялись. Спонтанная НСТ-активность варьировалась от 0,30 до 0,32 у.е.оп.пл., индуцированная – от 0,31 до 0,33 у.е.оп.пл. При этом коэффициенты стимуляции (КС) находились в пределах 1,01 – 1,04 (табл.1).

Таблица 1

Динамика НСТ-активности нейтрофилов крови негативных и иммунизированных морских свинок, $M \pm m$

Сутки исследования	Контрольная группа			Опытная группа		
	спонтанная, у.е.оп.пл.	индуцированная, у.е.оп.пл.	КС	спонтанная, у.е.оп.пл	индуцированная, у.е.оп.пл.	КС
до введения	0,31±0,07	0,31±0,05	1,02±0,02	0,30±0,06	0,31±0,03	1,03±0,05
7 сутки	0,30±0,07	0,31±0,04	1,01±0,07	0,53±0,02 ²	0,22±0,07 ¹	0,41±0,11
14 сутки	0,31±0,07	0,32±0,04	1,02±0,09	0,86±0,13 ¹	0,73±0,18 ¹	0,85±0,08
21 сутки	0,30±0,07	0,31±0,04	1,02±0,03	0,45±0,02 ¹	0,23±0,03 ¹	0,51±0,06
28 сутки	0,32±0,07	0,32±0,04	1,02±0,10	0,67±0,10 ¹	0,74±0,04 ¹	1,10±0,11
42 сутки	0,31±0,07	0,33±0,04	1,04±0,14	0,51±0,09	0,53±0,14	1,08±0,27

55 сутки	0,32±0,07	0,33±0,04	1,03±0,02	0,48±0,01 ²	0,41±0,02 ²	0,86±0,07
69 сутки	0,30±0,07	0,31±0,04	1,02±0,12	0,77±0,01 ¹	0,70±0,01 ¹	0,91±0,03
125 сутки	0,31±0,07	0,32±0,04	1,03±0,06	0,53±0,10	0,28±0,03	0,66±0,06
Примечание: ¹ – $p \leq 0,05$; ² – $p \leq 0,01$						

Тогда как у группы иммунизированных животных до иммунизации среднегрупповой показатель спонтанной НСТ-активности составил 0,30±0,06 у.е.оп.пл., при стимуляции бруцеллезным антигеном НСТ-активность составила 0,31±0,03 у.е.оп.пл., КС – 1,03±0,05.

К 7-м суткам исследования спонтанная НСТ-активность усиливалась в 1,8 раза ($p \leq 0,01$), тогда как индуцированная активность снижалась в 1,5 раза ($p \leq 0,05$), КС снижался в 2,5 раза относительно показателей до иммунизации.

Дальнейшее усиление спонтанной НСТ-активности происходило к 14-м суткам в 2,8 раза ($p \leq 0,05$). В отличие от более ранних сроков исследований мы наблюдали также интенсификацию показателей НСТ-теста, индуцированного бруцеллезным антигеном в 2,3 раза ($p \leq 0,05$). КС в этот срок снижался относительно показателя до иммунизации в 1,2 раза.

К 21-м суткам после иммунизации спонтанная НСТ-активность повышалась в 1,5 раза ($p \leq 0,05$), индуцированная НСТ-активность, снижалась в 1,4 раза ($p \leq 0,05$), КС в этот срок снижался в 2 раза относительно показателей до иммунизации.

К 28-м суткам от начала эксперимента вновь отмечена выраженная активизация внутриклеточного метаболизма нейтрофилов, которая сопровождалась увеличением как спонтанной в 2,2 раза ($p \leq 0,05$), так и индуцированной бруцеллезным антигеном реакции в 2,4 раза ($p \leq 0,05$). Также в этот срок зафиксировано максимальное среднегрупповое значение КС, которое составило 1,10±0,11.

В последующем к 42-м, 55-м и особенно к 69-м суткам наблюдения сохранился более высокий уровень спонтанной и индуцированной тетразолиевой активности нейтрофилов по сравнению с интактными морскими свинками. Если КС к 42-м суткам в среднем по группе составлял 1,08±0,27, то к 55-м и 69-м суткам снижался 1,2 и 1,1 раза соответственно относительно показателей до иммунизации.

К 125-м суткам от начала эксперимента значения спонтанной активности нейтрофилов увеличивалось в 1,8 раза. Индуцированная

тетразолиевая активность нейтрофилов, напротив, недостоверно уменьшалась в 1,1 раза. Вследствие этих изменений также происходило снижение КС в 1,6 раз относительно показателей до иммунизации.

Определение активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках. Спонтанная и индуцированная ферментная активность миелопероксидазы, которая также характеризует кислород-продуцирующую способность нейтрофилов, в ходе исследований проведенных у контрольной группы животных не имела статистически значимых изменений. Спонтанная активность миелопероксидазы варьировалась в пределах 2,58 – 2,70 у.е.оп.пл., индуцированная – 2,64 – 2,80, КС находился в пределах 1,02 – 1,10 (табл. 2).

Таблица 2
Динамика ферментативной миелопероксидазной активности нейтрофилов крови негативных и иммунизированных морских свинок, $M \pm m$

Сутки исследования	Контрольная группа			Опытная группа		
	спонтанная у.е.оп.пл.	индуцированная, у.е.оп.пл.	КС	спонтанная у.е.оп.пл.	индуцированная, у.е.оп.пл.	КС
до введения	2,62±0,06	2,74±0,05	1,05±0,03	2,62±0,06	2,74±0,05	1,05±0,03
7 сутки	2,59±0,11	2,68±0,09	1,04±0,07	2,41±0,06 ¹	2,06±0,11 ³	0,85±0,03 ²
14 сутки	2,64±0,06	2,75±0,05	1,04±0,12	2,15±0,07 ¹	1,97±0,10 ¹	0,91±0,05 ¹
21 сутки	2,58±0,03	2,68±0,11	1,04±0,09	1,67±0,13 ¹	1,72±0,10 ²	1,04±0,04
28 сутки	2,70±0,04	2,76±0,01	1,03±0,04	2,24±0,11 ¹	2,59±0,13	1,14±0,06
42 сутки	2,69±0,02	2,80±0,08	1,10±0,05	2,36±0,37	3,04±0,12	1,34±0,18
55 сутки	2,65±0,07	2,69±0,05	1,02±0,06	1,69±0,02 ³	2,11±0,04 ¹	1,24±0,01 ²
69 сутки	2,59±0,10	2,64±0,14	1,02±0,11	2,62±0,05 ¹	2,86±0,23	1,09±0,08
125 сутки	2,63±0,08	2,76±0,04	1,05±0,08	2,11±0,05 ¹	2,44±0,14	1,16±0,10

Примечание: ¹ – $p \leq 0,05$; ² – $p \leq 0,01$; ³ – $p < 0,001$

У опытной группы животных до иммунизации показатель спонтанной миелопероксидазной активности составил $2,62 \pm 0,06$ у.е.оп.пл., индуцированной – $2,74 \pm 0,05$ у.е.оп.пл., КС – $1,05 \pm 0,03$.

С 7-х по 21-е сутки отмечается достоверное снижение показателей спонтанной и индуцированной миелопероксидазной активности относительно соответствующих показателей до иммунизации. При этом минимальное среднегрупповое значение КС отмечено на 7 сутки исследования – $0,85 \pm 0,03$ у.е.оп.пл. ($p \leq 0,01$).

К 21-м сутки зафиксированы минимальные среднегрупповые значения спонтанной ($1,67 \pm 0,13$ у.е.оп.пл.) и индуцированной ($1,72 \pm 0,10$) активности миелопероксидазы, при этом среднегрупповой КС равен $1,04 \pm 0,04$. К 28-м суткам спонтанная и индуцированная активность, несмотря на тенденцию к возрастанию по сравнению с 21-и сутками, оставалась достоверно ниже показателей до иммунизации в 1,6 раза.

К 42-м суткам исследования спонтанная активность миелопероксидазы снижалась относительно показателя до иммунизации в 1,1 раза, индуцированная активность увеличивается относительно показателя до иммунизации в 1,1 раза и достигает максимальных значений – $3,04 \pm 0,12$ у.е.оп.пл., КС в данный срок исследования увеличивался в 1,3 раза и достигал максимального значения – $1,34 \pm 0,18$.

К 55-м суткам показатели спонтанной и индуцированной активности миелопероксидазы достоверно снижаются в 1,6 и 1,3 раза соответственно, КС в данный срок исследования увеличивался в 1,2 раза относительно показателей до иммунизации.

К 69-м суткам исследования спонтанная и индуцированная активность миелопероксидазы, а также КС не имеют достоверного различия с показателями до иммунизации.

В отдаленные сроки после иммунизации (125-е сутки) спонтанная и индуцированная активность миелопероксидазы снижается в 1,2 ($p \leq 0,05$) и 1,1 раза соответственно, КС увеличивался в 1,1 раза относительно показателей до иммунизации.

Определение активности катионных белков в фагоцитирующих клетках. Показатель катионных белков нейтрофилов (КБ), который в отличие от двух предыдущих тестов характеризует анаэробный метаболизм фагоцитов, в ходе исследований, проведенных у контрольной группы морских свинок, так же не имел достоверных изменений. Спонтанная активность

катионных белков составила в среднем 1,38 – 1,44 у.е.оп.пл., индуцированная – 2,17 – 2,25 у.е.оп.пл., КС 1,53 – 1,61 (табл. 3).

Таблица 3
Динамика неферментных катионных белков нейтрофилов крови негативных и иммунизированных морских свинок, М±m

Сутки иссле- довани- я	Контрольная группа			Опытная группа		
	спонтанн- ая у.е.оп.пл.	индуциро- ванная у.е.оп.пл.	КС	спонтанн- ая у.е.оп.пл.	индуциров- анная у.е.оп.пл.	КС
до введе- ния	1,42±0,18	2,22±0,07	1,57±0,15	1,39±0,05	2,22±0,31	1,57±0,24
7 сутки	1,40±0,24	2,20±0,03	1,60±0,11	1,43±0,01	2,07±0,20	1,46±0,15
14 сутки	1,40±0,31	2,24±0,11	1,59±0,21	0,61±0,06 ¹	1,68±0,26	2,74±0,46 ₁
21 сутки	1,39±0,13	2,20±0,08	1,57±0,09	0,83±0,06 ¹	0,70±0,04 ³	0,85±0,02 ₁
28 сутки	1,38±0,32	2,23±0,13	1,61±0,16	0,85±0,10 ²	1,56±0,20	1,84±0,21 ₃
42 сутки	1,44±0,09	2,25±0,09	1,56±0,19	1,34±0,19	0,95±0,08 ³	0,75±0,14 ₃
55 сутки	1,43±0,14	2,17±0,08	1,54±0,15	1,31±0,04	0,83±0,19 ²	0,63±0,13 ₂
69 сутки	1,44±0,21	2,18±0,05	1,54±0,20	2,56±0,12 ¹	1,49±0,16 ¹	0,59±0,10 ₃
125 сутки	1,43±0,18	2,22±0,12	1,55±0,18	2,05±0,12 ²	1,51±0,04 ¹	0,74±0,02 ₁

Примечание: ¹ – p≤0,05; ² – p≤0,01; ³ – p<0,001

Тогда как у группы иммунизированных морских свинок цитофотометрические параметры содержания КБ перед иммунизацией характеризовались следующими значениями: 1,39±0,05 у.е.оп.пл. при постановке реакции с неактивированными нейтрофилами и 2,22±0,31 у.е.оп.пл. при их стимуляции бруцеллезным антигеном, КС – 1,57±0,24.

К 7-м суткам после инокуляции исследуемые показатели существенно не отличались от величин КБ, установленных нами в начале эксперимента.

В дальнейшем (с 14-х по 28-е сутки) отмечалось достоверное снижение концентрации КБ при постановке реакции без антигеннной

стимуляции фагоцитов, в 2,3 раза на 14-е сутки, в 1,8 раза – 21-е сутки, в 1,6 раза – 28-е сутки.

В данный период исследования (с 14-х по 28-е сутки) отмечено снижение индуцированная активности катионных белков. К 14-м суткам данный показатель снижался в 1,3 раза, к 21-м суткам отмечено наиболее значительное уменьшение концентрации КБ в нейтрофилах в 3,2 раза ($p<0,001$), к 28-м суткам в 1,4 раза. КС на 14-е сутки исследования увеличивался в 1,8 раза и достигал максимального значения $2,74\pm0,46$, на 21-е сутки отмечено достоверное снижение КС в 1,8 раза, на 28-е сутки зафиксировано повышение КС в 1,2 раза ($p<0,001$), относительно показателя до иммунизации.

На 42-е и 55-е сутки спонтанная активность продукции КБ восстановилась до уровня, который зарегистрирован перед иммунизацией, в следующие сроки исследования с высокой степенью достоверности увеличилась в 1,8 раза на 69-е сутки, в 1,5 раза на 125-е сутки.

Снижение содержания КБ нейтрофилов отмечено при стимуляции бруцеллезным антигеном, на 42-е и 55-е сутки после иммунизации в 2,3 и 2,7 раза соответственно. На 69-е и 125-е сутки после иммунизации индуцированная продукция КБ снижалась в 1,5 раза, относительно показателя до иммунизации.

Среднегрупповые значения КС, в период исследования с 42-х по 125-е сутки, достоверно снижались.

Динамика выработки агглютинирующих и комплементсвязывающих антител. В результате проведенных серологических исследований у контрольной группы морских свинок специфических бруцеллезных антител не обнаружено.

У группы иммунизированных морских свинок выработка агглютинирующих и комплементсвязывающих антител наблюдалась с 14-х по 69-е сутки исследования (рис. 1). При этом к 14-м суткам в РА и РСК реагировало 40% животных. К 21-м сутками в РА реагировало 100% животных, в РСК – 60%. К 28-м суткам в РА и РСК реагировало 40% животных. К 42-м суткам исследования в РА реагировали 60% животных, в РСК – 20%. К 55-м суткам после начала эксперимента в РА реагировали 40% животных, в РСК реагирующих не зафиксировано. К 69-м суткам в РА реагировало 60% животных, в РСК – 20% животных.

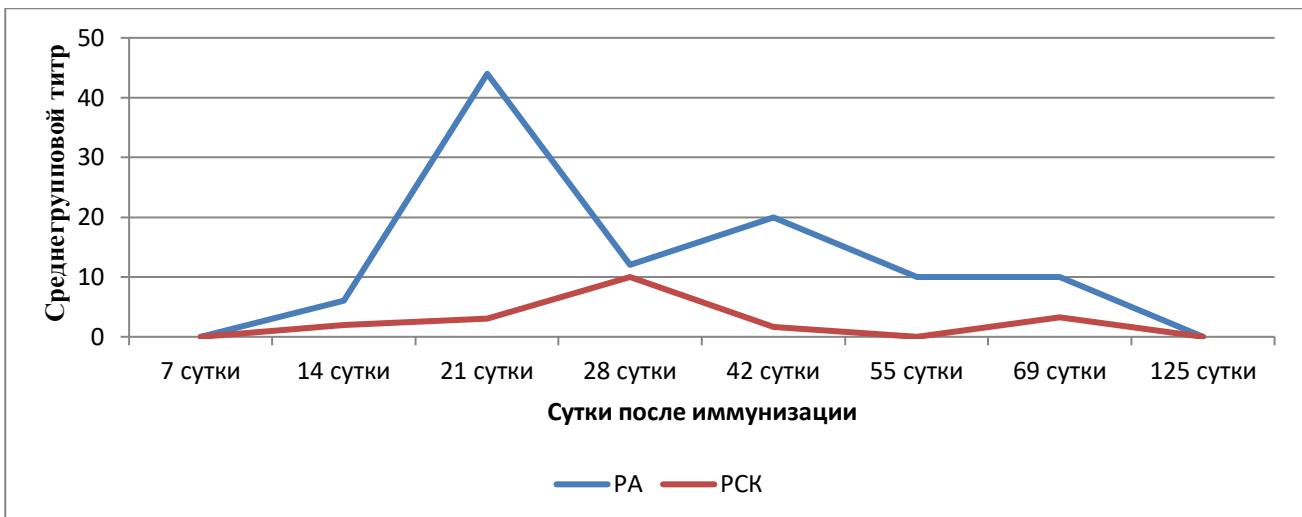


Рис 1. Результаты серологических исследований иммунизированных морских свинок.

Максимальный уровень агглютинирующих антител зафиксирован у морских свинок к 21 суткам после иммунизации, повторная активация агглютининов наблюдалась на 42 сутки исследования, но в более низких титрах. Максимальный уровень комплементсвязывающих антител отмечался к 28 суткам после начала эксперимента.

Таким образом применение бруцеллезного антигена в качестве стимулятора клеточных реакций не вызывает активацию бактерицидных систем нейтрофилов неиммунных животных.

Максимальные показатели специфической активации нейтрофилов иммунизированных морских свинок в НСТ-тесте приходятся на 28-е сутки, что совпадает с максимальным уровнем синтеза комплементсвязывающих антител.

Максимальная специфическая активация миелопероксидазы нейтрофилов иммунизированных морских свинок происходит на 42-е сутки, что совпадает с повторной активацией агглютинирующих антител.

Наиболее выраженную специфическую активность неферментные катионные белки нейтрофилов проявляют на 14-е сутки после введения иммунобиологического препарата, опережая выработку гуморального иммунного ответа на 7 суток.

Пример 2. Для сравнительного изучения динамики показателей функциональной активности нейтрофилов периферической крови в разные сроки после иммунизации был проведен эксперимент на 4–6-месячном молодняке крупного рогатого скота ($n=50$).

Животных разделили на группы ($n=25$), в зависимости от применяемой вакцины против бруцеллеза:

1-я группа – вакцинированные против бруцеллеза крупного рогатого скота вакциной из слабоагглютиногенного штамма *B. abortus* 82;

2-я группа – вакцинированные против бруцеллеза крупного рогатого скота вакциной из неагглютиногенного штамма *B. abortus* RB-51.

Исследования крови проводили до иммунизации и после иммунизации 1 раз в неделю. Наиболее диагностически значимые показатели во всех реакциях были зарегистрированы на 14 и 28 сутки после иммунизации.

В качестве антигена при определении индуцированной активности *in vitro* использовали бруцеллезный антиген – ультразвуковой лизат *B. abortus*.

Определение общей окислительно-восстановительной активности нейтрофилов в НСТ-тесте. Установлено, что у животных, иммунизированных вакциной из штамма *B. abortus* 82, до иммунизации спонтанная НСТ-активность составила $0,12\pm0,01$ у.е.оп.пл., индуцированная – $0,15\pm0,03$ у.е.оп.пл., КС – $1,27\pm0,19$. К 14-м суткам исследования спонтанная активность уменьшилась в 1,1 раза, индуцированная – в 1,2 раза, при этом КС уменьшился в 1,2 раза относительно соответствующих показателей до иммунизации. К 28-м суткам исследования спонтанная и индуцированная НСТ-активность была выше соответствующего показателя до иммунизации в 1,5 и 1,2 раза соответственно, КС в этот срок меньше показателя до иммунизации в 1,2 раза (табл. 4).

Таблица 4

Динамика НСТ-активности нейтрофилов крови крупного рогатого скота, иммунизированного противобруцеллезными вакцинами, $M\pm m$

Группа животных	Сутки, исследования	Спонтанный у.е.оп.пл.	Индуцированный у.е.оп.пл.	КС
Вакцинированные <i>B. abortus</i> 82	до ведения	$0,12\pm0,01$	$0,15\pm0,03$	$1,27\pm0,19$
	14 сутки	$0,11\pm0,01$	$0,13\pm0,01$	$1,20\pm0,07$
	28 сутки	$0,17\pm0,01^2$	$0,18\pm0,02$	$1,08\pm0,08^1$
Вакцинированные <i>B. abortus</i> RB-51	до ведения	$0,32\pm0,16$	$0,15\pm0,02$	$0,82\pm0,44$
	14 сутки	$0,21\pm0,05^1$	$0,14\pm0,01$	$0,85\pm0,22$
	28 сутки	$0,14\pm0,02^2$	$0,18\pm0,02$	$1,34\pm0,19^3$

Примечание: ¹ – $p\leq0,05$; ² – $p\leq0,01$; ³ – $p<0,001$

Тогда как у животных, иммунизированных вакциной из штамма *B. abortus RB-51*, до иммунизации спонтанная НСТ-активность составила $0,32 \pm 0,16$ у.е.оп.пл., индуцированная $0,15 \pm 0,02$ у.е.оп.пл., КС – 0,82. К 14-м суткам эксперимента спонтанная и стимулированная активность снижались в 1,5 и 1,1 раза соответственно, КС в этот срок незначительно увеличивался относительно показателя до иммунизации. К 28-м суткам спонтанная НСТ-активность снижалась в 2,3 раза, тогда как индуцированная увеличивалась в 1,2 раза относительно показателей до иммунизации, КС в этот срок превышал показатель до иммунизации в 1,6 раза.

Определение активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках. У группы животных, иммунизированных вакциной из штамма *B. abortus* 82, до иммунизации спонтанная активность миелопероксидазы составила $3,26 \pm 0,02$ у.е.оп.пл., индуцированная – $3,25 \pm 0,04$ у.е.оп.пл., КС – $0,99 \pm 0,01$. К 14 суткам отмечено незначительное угнетение антимикробных пептидов, как в спонтанном, так и в индуцированном варианте постановки, в 1,02 и 1,03 раза соответственно, КС в этот срок не изменялся. К 28 суткам исследования спонтанная и индуцированная миелопероксидазная активность снижалась в 1,3 и 1,2 раза соответственно, тогда как КС увеличивался в 1,1 раза (табл.5)

Таблица 5
Динамика миелопероксидазной активности нейтрофилов крови крупного рогатого скота, иммунизированного противобруцеллезными вакцинами, $M \pm m$

Группа животных	Сутки исследования	Спонтанный у.е.оп.пл.	Индуцированный у.е.оп.пл.	КС
Вакцинированные <i>B. abortus</i> 82	до ведения	$3,26 \pm 0,02$	$3,25 \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,01$
	14 сутки	$3,17 \pm 0,02$	$3,17 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,01$
	28 сутки	$2,58 \pm 0,05^2$	$2,73 \pm 0,06^3$	$1,06 \pm 0,02^1$
Вакцинированные <i>B. abortus</i> RB-51	до ведения	$3,08 \pm 0,05$	$3,03 \pm 0,04$	$0,98 \pm 0,01$
	14 сутки	$3,15 \pm 0,04$	$3,15 \pm 0,04$	$1,00 \pm 0,01$
	28 сутки	$3,13 \pm 0,03$	$2,99 \pm 0,05$	$0,95 \pm 0,10$

Примечание: ¹ – $p \leq 0,05$; ² – $p \leq 0,01$; ³ – $p < 0,001$

У группы животных, иммунизированных вакциной из штамма *B. abortus* RB-51, до иммунизации спонтанная активность миелопероксидазы составила $3,08 \pm 0,05$ у.е.оп.пл., индуцированная – $3,03$ у.е.оп.пл., КС – $0,98$. К 14 суткам регистрировалось незначительное увеличение активности миелопероксидазы в спонтанном и индуцированном вариантах постановки в $1,02$ и $1,04$ раза соответственно. К 28 суткам спонтанная миелопероксидазная активность была выше показателя до иммунизации, тогда как индуцированная активность оставалась ниже показателя до иммунизации, КС в этот срок снижался относительно показателя до иммунизации в $1,1$ раз.

Определение активности катионных белков в фагоцитирующих клетках. У группы животных, иммунизированных вакциной из штамма *B. abortus* 82, до иммунизации спонтанная активность катионных белков составила $2,51 \pm 0,25$ у.е.оп.пл., индуцированная – $2,78 \pm 0,04$ у.е.оп.пл., КС – $1,15 \pm 0,12$. К 14 суткам отмечено угнетение выработки катионных белков, как в спонтанном, так и в индуцированном варианте постановки в $1,2$ раза, при этом КС незначительно снижался. К 28 суткам исследования спонтанная и индуцированная активность катионных белков снижалась в $1,2$ и $1,02$ раза соответственно, КС в этот срок исследования увеличивался в $1,2$ раза относительно показателя до иммунизации (табл. 6).

Таблица 6

Динамика активности катионных белков нейтрофилов крови крупного рогатого скота, иммунизированного противобруцеллезными вакцинами, $M \pm m$

Группа животных	Сутки исследования	Спонтанный у.е.оп.пл.	Индуцированный у.е.оп.пл.	КС
Вакцинированные <i>B. abortus</i> 82	до ведения	$2,51 \pm 0,25$	$2,78 \pm 0,04$	$1,15 \pm 0,12$
	14 сутки	$2,12 \pm 0,21$	$2,26 \pm 0,19^2$	$1,14 \pm 0,14$
	28 сутки	$2,10 \pm 0,18$	$2,86 \pm 0,08$	$1,43 \pm 0,11^1$
Вакцинированные <i>B. abortus</i> RB-51	до ведения	$2,15 \pm 0,48$	$2,93 \pm 0,34$	$1,43 \pm 0,18$
	14 сутки	$1,03 \pm 0,04^1$	$2,28 \pm 0,23^3$	$2,20 \pm 0,19^1$
	28 сутки	$1,23 \pm 0,19^2$	$1,69 \pm 0,26^1$	$1,41 \pm 0,21$

Примечание: ¹ – $p \leq 0,05$; ² – $p \leq 0,01$; ³ – $p < 0,001$

У группы животных, иммунизированных вакциной из штамма *B. abortus RB-51*, до иммунизации спонтанная активность катионных белков составила $2,15\pm0,48$ у.е.оп.пл., индуцированная – $2,93$ у.е.оп.пл., КС – $1,43\pm0,18$. К 14 суткам регистрировалось угнетение активности катионных белков, как в спонтанном, так и в индуцированном варианте постановки в 2,1 и 1,3 раза соответственно, КС увеличивался в 1,5 раза. К 28 суткам спонтанная активность катионных белков оставалась ниже показателя до иммунизации в 1,8 раза, индуцированная – в 1,7 раз, КС снижался в 1,6 раза относительно показателя на 14 сутки, и был незначительно ниже показателя до иммунизации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что применение бруцеллезного антигена при постановке клеточных тестов способствует специфической активации бактерицидных систем нейтрофилов животных *in vitro*.

Оценка функциональной активности нейтрофилов в ответ на стимуляцию бруцеллезным антигеном способствует проведению достоверного контроля клеточной перестройки организма в период формирования иммунного ответа при сенсибилизации бруцеллами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Специфическая профилактика бруцеллеза животных (современные проблемы) / А.А. Муковнин, П.К. Аракелян, Д.А. Тарануха [и др.] // Ветеринария. – 2024. – № 5. – С. 3-8. – DOI 10.30896/0042-4846.2024.27.5.03-08.
2. Технологичность разных схем иммунизации крупного рогатого скота против бруцеллеза с возможностью ранней поствакцинальной диагностики / П.К. Аракелян, Н.В. Христенко, Ю.Е. Гайворонская [и др.] // Ветеринария. – 2023. – № 5. – С. 11-16. – DOI 10.30896/0042-4846.2023.26.5.11-15.
3. Молекулярные механизмы персистенции возбудителя бруцеллеза / Ю.К. Кулаков // Журнал микробиология. 2018. № 4. С. 68-76. DOI 10.36233/0372-9311-2018-4-68-76.

4. Особенности паразитарной системы бруцеллеза / Н.Г. Горчакова // Научно-исследовательские публикации. 2017. № 4. С. 14-25.

5. Показатели клеточного иммунитета у морских свинок при вакцинации и экспериментальной бруцеллезной инфекции / А.М. Алимов, Л.А. Закирова // Ученые записки казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2016. № 3. С. 4-6.

6. Оценка механизмов иммуногенеза у морских свинок, сенсибилизованных бруцеллами / Л.В. Дегтяренко, В.С. Власенко, В.С. Бронников // Вестник ветеринарии. – 2015. – № 2(73). – С. 42-46.

7. The Roles of Neutrophil-Derived Myeloperoxidase (MPO) in Diseases / W. Lin, H. Chen, X. Chen, C. Guo // The New Progress. Antioxidants. – 2024. – No. 13, – P. 132. DOI 10.3390/antiox13010132.

8. Сравнительная характеристика кислородзависимой и кислороднезависимой бактерицидных систем нейтрофилов при лейкозной инфекции / В.С. Власенко, Е.А. Вишневский // Вестник КрасГАУ. – 2020. – № 11(164). – С. 170-174. – DOI 10.36718/1819-4036-2020-11-170-174.

9. The cytochemical study of oxygen-dependent and oxygen-independent components of bactericidal activity of dog' peripheral blood leukocytes / A. Bokarev, A. Stekolnikov, A. Kudryashov, M. Narusbaeva, A. Minina // International Journal of Veterinary Science. –2022. – No. 11(1). – P. 104-109. DOI 10.47278/journal.ijvs/2021.085.

Научное издание

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
НЕЙТРОФИЛОВ У ЖИВОТНЫХ,
СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ БРУЦЕЛЛАМИ**

Методические рекомендации

Подписано в печать 25.08.2025. Формат 60/84 1/16.
Гарнитура «Times New Roman». Печ. л. 3,75(3,48).
Бумага офсетная. Печать оперативная.
Тираж 50 экз.

Отпечатано в типографии ИП Макшеевой Е.А.
Омск-644034, ул. Долгирева, 126, тел.: 89083194462