

УДК 619: 616. 98: 579.873. 21Т

Дубовой Б.Л., Добрелин В.И.*(ГНУ СКЗНИВИ РАСХН, ГНУ ДЗНИИСХ РАСХН)*

ПРИМЕНЕНИЕ РСЛЛ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛИНОВЫХ РЕАКЦИЙ

Ключевые слова: Туберкулез, реакция специфического лизиса лейкоцитов, сенсибилизация, прижизненная диагностика, показатель РСЛЛ.

Животноводческие хозяйства Ростовской области благополучны по туберкулезу с 2008 г., она является одной из благополучных по этой инфекции в Северокавказском регионе страны. Вместе с тем на фоне стабилизации эпизоотической ситуации по туберкулезу крупного рогатого скота возрастает проблема неспецифических туберкулиновых реакций в благополучных по туберкулезу хозяйствах. В Ростовской области, как и в других регионах России, наблюдается выявление реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота, у которого не удается подтвердить туберкулез лабораторными методами.

В системе мер профилактики и ликвидации туберкулеза крупного рогатого скота огромное значение имеет своевременная и эффективная диагностика болезней.

Эпизоотологическую обстановку по туберкулезу в Ростовской области осложняют проявления псевдо- и парааллергической неспецифической реактивности организма крупного рогатого скота к туберкулину, обуславливающие неясность эпизоотической обстановки, необоснованный убой продуктивных животных, потерю продукции и приплода, ограничение селекционно-племенной работы, а также дополнительные затраты на дифференциальную диагностику, профилактические ветеринарно-санитарные и общехозяйственные мероприятия.

Природа неспецифических туберкулиновых реакций имеет полиэтиологический характер и зависит от многочисленных факторов: сенсибилизации организма животных атипичными микобактериями, микобактериями птичьего вида, паратуберкулезного энтерита, от сопутствующих других инфекционных болезней (лейкоз, некробактериоз и др.), от заболеваний травматического характера (ретикулит, ретикулоперикардит) от гнойных процессов, от гельминтозных поражений, микозных заболеваний, а также от многих стрессовых факторов.

При туберкулезе, как и при многих инфекционных заболеваниях, возникает инфекционная аллергия, обусловленная сенсибилизацией организма микобактериями туберкулеза и продуктами их жизнедеятельности. Аллергические туберкулиновые пробы имеют большое диагностическое значение, так как выявляют повышенную чувствительность клеток и тканей к специфическим аллергенам у инфицированных и больных животных.

В настоящее время существует большое количество тестов для изучения повышенной чувствительности замедленного типа (ПЧЗТ) при туберкулезе. А поскольку аллергия в той или иной степени является местным отражением общего состояния повышенной чувствительности, соответственно аллергическую реакцию можно получить в любом органе или ткани, поэтому со времени открытия туберкулина для ветеринарной и медицинской практики предложен целый ряд различных методов его применения.[1]

В дальнейшем, некоторые из методов, вследствие трудности массового применения и недостаточной эффективности, потеряли свое первоначальное значение.

В настоящее время в ветеринарии применяется в основном внутрикожный метод, в некоторых случаях используют глазную, пальпебральную и внутривенную пробы. Но на основании анализа литературных данных и результатов собственных исследований мы пришли к выводу, что между общепринятыми туберкулиновыми тестами не установлено стойко закрепленной связи, и при совместном применении они лишь дополняют друг друга.

В затруднительных случаях при постановке диагноза и для дифференциации реакций, обусловленных сенсибилизацией организма атипичными микобактериями, используется симультанная проба, где одновременно с туберкулином для млекопитающих применяют аллергены из микобактерий, отличающихся от возбудителя

туберкулеза бычьего и человеческого видов.[3, 5]

Однако в ветеринарной практике симулянтная проба в настоящее время не является надежным специфичным методом, позволяющим с абсолютной уверенностью отличить животное, зараженное туберкулезом, от проявления повышенной чувствительности к туберкулину по другим причинам.

Таким образом, феномен неспецифической реактивности животных при проведении аллергической диагностики туберкулеза побуждает исследователей активизировать поиски более специфичных и менее трудоемких методов диагностики. Оценивая эффективность различных исследований – аллергического, патологоанатомического, бактериологического, культурального и биологического, можно заключить, что одно из них взятое изолированно, не дает полного ответа и только комплексное их использование позволяет судить о наличии или отсутствии заболевания животных туберкулезом.

Эффективность борьбы с туберкулезом определяется степенью совершенства методов его диагностики. Профилактика туберкулеза базируется на результатах диагностики, занимающей ведущее место в системе противоэпизоотических мероприятий, которой уделяют постоянное внимание в комплексе научных исследований и практических разработок.

Поэтому учеными ГНУ СКЗНИВИ РАСХН, для дифференциации туберкулиновых реакций и дифференциальной прижизненной диагностики туберкулеза в хозяйствах и частном секторе, проводилась работа над внедрением в лабораторную практику реакции специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ), которая позволяет выявлять инфицированных возбудителем туберкулеза и исключить убой животных с неспецифическими реакциями.

Способ включает выявление туберкулиновой пробой в хозяйствах и дворах плановыми аллергическими исследованиями реагирующих животных. У положительно реагирующих на туберкулин животных проводят гематологические туберкулиновые исследования реакцией специфического лизиса лейкоцитов с использованием в качестве диагностикомов ППД-туберкулина для млекопитающих, ППД-туберкулина для птиц, КАМ и других аллергенов, приготовленных из инфекционных и инвазионных возбудителей.

Способ позволяет провести дифферен-

циацию специфических и неспецифических (вызванных агентами нетуберкулезной природы) реакций на туберкулиновую внутрикожную пробу и диагностировать туберкулез на ранней стадии заболевания, а так же определить заразные агенты нетуберкулезной природы, вызвавшие аллергическое состояние организма животных и сенсибилизацию к внутрикожному введению туберкулина.[4]

Ветеринарной практике нужен выход из сложившегося затруднения в прижизненной диагностике туберкулеза крупного рогатого скота, Этот проблемный вопрос решается в освоении и внедрении в лабораторную практику методов аллергической диагностики туберкулеза с использованием реакций клеток крови *in vitro*, в частности реакции специфического лизиса лейкоцитов.

Использование предлагаемого нами «Способа ранней диагностики туберкулеза животных» (патент РФ №2366454) позволяет установить однозначно специфичность или неспецифичность реакции организма животного на внутрикожное введение туберкулина и окончательно поставить диагноз, не убивая животное. Основой метода является аллергическая диагностическая проба – реакция специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ).

Реакция основана на специфическом усилении склеивания (агломерации) и лизиса лейкоцитов при добавлении к крови сенсибилизированного животного *in vitro* аллергена, вызвавшего сенсибилизацию. Положительная туберкулиновая проба (реакция кожи на туберкулин) – классическое проявление феномена повышенной чувствительности замедленного типа, выраженное миграцией в кожу сенсибилизированных лимфоцитов и последующим воспалением этого участка. Реакция специфического лизиса лейкоцитов основана на немедленно проявляющейся повышенной чувствительности лейкоцитов к повторному контакту с антигеном (аллергеном) вне организма.[3]

РСЛЛ это эффективный метод выявления гиперчувствительности замедленного типа методом *in vitro*, которая обладает строгой специфичностью, дает возможность количественного учета степени сенсибилизации организма, обнаружения в ранние сроки в организме животных возбудителя туберкулеза и определение вида микобактерий, вызвавшего сенсибилизацию, и позволяет получить ответ через 3-4 часа после взятия крови.

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ТУБЕРКУЛЕЗ РСЛЛ

Сущность способа ранней диагностики туберкулеза животных состоит в том, что от животных, давших положительную реакцию на туберкулиновую пробу в благополучных хозяйствах и дворах при плановых аллергических исследованиях берут кровь и проводят РСЛЛ с использованием в качестве диагностикумов ППД-туберкулина для млекопитающих, ППД-туберкулина для птиц и КАМ, и рассчитывают показатель РСЛЛ. При его значении с ППД-туберкулином для млекопитающих 10% и более диагностируют туберкулез, а при таком же значении с другими диагностикумами – инфицирование и сенсибилизацию микобактериями птичьего вида или атипичными нетуберкулезными микобактериями.

Животных, давших положительные результаты исследования реакцией СЛЛ с ППД-туберкулином для млекопитающих, считают туберкулезными и действуют по Инструкции о мероприятиях по профилактике и ликвидации туберкулеза.

КРАТКАЯ МЕТОДИКА РСЛЛ

Из опытных пробирок в лунку планшета, содержащую 0,05 мл 3,8%-ного раствора цитрата натрия (или другой антикоагулянт), вносят 0,1 мл исследуемой крови и добавляют рабочую дозу туберкулина (ППД для млекопитающих, ППД для птиц и КАМ) в объеме 0,05 мл. Лунки планшета с контрольной кровью заполняют в том же объеме физиологическим раствором без туберкулина.

Кровь в лунках планшета инкубируют в течение 2 часов при температуре 37°C, встряхивая через каждые 30 мин. Затем, из контрольной и опытной лунок берут по 0,02 мл крови и переносят в лунку, содержащую 0,4 мл жидкости Тюрка (3-5% раствор уксусной кислоты, подкрашенный несколькими каплями раствора метиленового синего), для разрушения эритроцитов и

окраски ядер лейкоцитов. Проводят подсчет лейкоцитов в камере Горяева по принятому в гематологии методу во всех клетках, и подсчитывают показатели реакции СЛЛ (в процентах) по формуле:

$$\text{РСЛЛ} = \frac{\text{Лк} - \text{Ло}}{\text{Лк}} \times 100\%$$

Где Лк и Ло – абсолютное количество лейкоцитов в контрольной и опытной пробах. РСЛЛ считают положительной при показателе 10% и выше.

Реакция специфического лизиса лейкоцитов – является одним из методов специфической аллергической диагностики, применяемая для определения повышенной чувствительности замедленного типа *in vitro* и основанная на воздействии специфических антигенов на сенсибилизированные иммунокомпетентные лимфоидные клетки.[4]

«Способ ранней диагностики туберкулеза животных» (патент РФ №2366454), внедренный в лабораторную аллергическую диагностику, позволяет провести дифференциацию специфических и неспецифических (вызванных агентами нетуберкулезной природы) реакций на туберкулиновую внутрикожную пробу и диагностировать туберкулез на ранней стадии заболевания. Так же поможет определить заразные агенты нетуберкулезной природы, вызвавшие аллергическое состояние организма животных и сенсибилизацию к внутрикожному введению туберкулина и может быть использован для прижизненной диагностики туберкулеза животных в хозяйствах и частном секторе.

Поэтому, чтобы сохранить достигнутое стабильное благополучие ранее оздоровленных хозяйств, профилактика туберкулеза в области должна основываться как на общепринятых мероприятиях, так и на совершенстве методов рациональной дифференциальной диагностики туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота.

Резюме: Статья затрагивает проблемный вопрос многочисленных неспецифических реакций на диагностическую туберкулиновую пробу у крупного рогатого скота в хозяйствах и частных подворьях, который решается в освоении и внедрении в лабораторную ветеринарную практику методов аллергической дифференциальной диагностики туберкулеза с использованием реакций клеток крови *in vitro*, в частности реакции специфического лизиса лейкоцитов.

SUMMARY

Problems of numerous non-specific reactions to diagnostic tuberculin skin test in cattle on farms and backyard is solved in the development and implementation of laboratory methods for allergic veterinary practice differential diagnosis of tuberculosis using the reactions of blood cells *in vitro*, in particular the reaction of specific lysis of leukocytes.

Keywords: Tuberculosis, reaction of specific lysis of leukocytes, sensibilization, in vivo diagnostics, index RSLL.

Литература

1. Донченко А.С. Дифференциальная диагностика туберкулиновых реакций в благополучных по туберкулезу хозяйствах: Методические рекомендации / А.С. Донченко, Н.А. Донченко, Колосов А.А. // Новосибирск, 2002.
2. Луговская С.А., Лабораторная гематология / С.А. Луговская, В.Т. Морозока, М.Е. Почтарь, В.В. Долгов // М., 2002.
3. Наставление по диагностике туберкулеза животных. Министерство с/х. Российской Федерации. Департамент ветеринарии 18.11.2002. Ветеринарный консультант, 2004. - №4,
4. Пат. 2366454 Российская Федерация, МПК А61К 39/04 (2006.01). Способ ранней диагностики туберкулеза животных / Дубовой Б.Л.; заявитель и патентообладатель Новочеркасск. ГНУ СКЗНИВИ. - №2007128465/13; заявл. 24.07.07; опубл. 27.01.09, бюл. №25
5. Профилактика инфекционных болезней 10 раздел «Туберкулез» Санитарные правила СП 3.1.093-96. Ветеринарные правила ВП 13.3.1325-96 Госкомсанэпиднадзор России, Минсельхозпрод России Москва.1996.

Контактная информация об авторах для переписки

Дубовой Борис Лаврентьевич, главный научный сотрудник лаборатории по изучению инфекционных болезней с.-х. животных и птиц ГНУ СКЗНИВИ, доктор вет. наук, профессор Служебный адрес: 346421, Ростовская обл., г. Новочеркасск, Ростовское шоссе, 0, ГНУ СКЗНИВИ РАСХН. E-mail: skznivi@novoch.ru

Добрелин Вадим Иванович, ведущий научный сотрудник отдела животноводства ГНУ ДЗНИИСХ, кандидат вет. наук. Служебный адрес: 346735, Ростовская обл., Аксайский район, п. Рассвет, ул. Институтская,1, ГНУ ДЗНИИСХ РАСХН, E-mail: dzniiisx@aksay.ru

УДК: 619:616.992.28.001

Шарафутдинов А.М.

(Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия)

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА ГРИБА CANDIDA ALBICANS И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ

Ключевые слова: кандидамикоз, гриб Candida albicans, протективный антиген, свиноматка, агглютинины.

Введение.

В последнее время в различных регионах нашей страны, занимающихся свиноводством, нередко регистрируются массовые желудочно-кишечные заболевания молодняка, большая часть которых имеет инфекционную природу.

Перевод свиноводства на промышленную основу изменил условия содержания и ухода за животными, в связи с чем возросло число заболеваний, возникающих под воздействием широко распространенных и факультативно патогенных возбудителей. При этом особую актуальность приобретает вопрос сохранения молодняка.

Появляются болезни, вызываемые группой условно патогенных микроорганизмов. Часто на организм при этом действует не один возбудитель, а группа (ассоциация) микроорганизмов, которые обуславливают тяжелое течение болезни, сильно выраженный токсикоз [6].

К этой группе микроорганизмов относится и гриб Candida albicans – возбудитель кандидамикоза. Данный микроорганизм вызывает заболевание молодняка свиней как самостоятельно, так и в ассоциации с другими условно-патогенными микроорганизмами [6; 7].

Исследования, проведенные зарубеж-