

На правах рукописи



4849018

ВЛАСЕНКО
Василий Сергеевич

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ И КОРРЕКЦИИ
ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ И ЛЕЙКОЗЕ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

9 ИЮН 2011

Казань – 2011

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

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Бажин Михаил Аристоклевиц

Официальные оппоненты:

- доктор ветеринарных наук, профессор Садыков Н.С.;
- доктор ветеринарных наук, профессор Сафин М.А.;
- доктор биологических наук Букова Н.К.

Ведущая организация: - Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН (г. Екатеринбург).

Защита состоится «28» июня 2011 г. в «10⁰⁰» часов на заседании диссертационного совета Д-220.012.01 при Федеральном центре токсикологической и радиационной безопасности животных (420075, Россия, Казань, Научный гор.-2)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального центра токсикологической и радиационной безопасности животных

Автореферат разослан «__» _____ 2010 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета, к.в.н.

Степанов В.И.

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Туберкулез до настоящего времени остается одним из самых распространенных зооантропонозных заболеваний, передающегося от больных животных человеку, и в зонах распространения причиняет огромный социальный и экономический ущерб. Несмотря на достигнутое значительное улучшение эпизоотической обстановки в стране некоторые ее регионы остаются неблагополучными по туберкулезу крупного рогатого скота и, в связи с этим, не исключена возможность заноса возбудителя этого заболевания в хозяйства благополучных зон (А.С. Донченко, В.Н. Донченко, 1994; В.Г. Ошепков, 2001, 2007; Ю.И. Смолянинов с соавт., 2003; А.Х. Найманов с соавт., 2009; Н.М. Колычев, 2010 и др.).

В системе мер борьбы с туберкулезом особое место отводится иммунодиагностике и иммунопрофилактике. Вопросы совершенствования методов и средств специфической профилактики обстоятельно освещены в нашей стране в научных трудах М.Н. Верещагина (1926), П.П. Вишневого (1927), В.Н. Матвеева (1936), А.М. Говорова (1954), Н.А. Александрова (1975), Х.К. Гизатулина, М.А. Сафина (1980), М.А. Сафина (1982, 1983, 1985), Д.Д. Новака (1984), Б.Я. Хайкина с соавт. (1984), А.И. Кузина (1987), А.С. Донченко (1983, 1995), Н.А. Донченко (2008) и других ученых. Данные многих научных исследований и результаты практического применения вакцинопрофилактики в общем комплексе противотуберкулезных мер указывают на довольно высокую ее эффективность. Применяемая живая вакцина БЦЖ, позволяет сократить сроки оздоровления ферм с меньшими материальными затратами, однако при этом создаются трудности в диагностике туберкулеза (длительные поствакцинальные реакции на взрослом скоте).

Необходимость в ряде угрожаемых и неблагополучных по туберкулезу хозяйств создания у животных перманентного (постоянного) противотуберкулезного иммунитета (в течение 4-6 лет) без длительного проявления кожной сенсибилизации требует создания новых экологически безопасных молекулярных вакцин.

Одной из наиболее важных задач иммунологии является поиск путей и средств целенаправленной регуляции иммуногенеза. Для более эффективного восстановления реактивности у животных можно использовать специфические иммуномодуляторы, позитивно воздействующие на систему иммунитета и не осложняющие контроль за туберкулезной инфекцией в стадах. Такие молекулярные препараты могут быть созданы на основе конъюгации антигенов, выделенных из вакцинного штамма БЦЖ, с полимеразной матрицей.

Разработка новых молекулярных вакцин и иммуномодуляторов и способов их применения в животноводстве обязывает вести контроль за здоровьем животных. Наиболее информативные в этом плане иммунологические методы оценки. Следовательно, оптимизировать существующие иммунологические методы с целью контроля и коррекции иммунного статуса, а также при изучении инфекционной патологии животных перспективно.

Лейкоз крупного рогатого скота в настоящее время распространен во многих субъектах Российской Федерации и составляет в структуре инфекционных

заболеваний 62,7%. Ежегодно регистрируют несколько тысяч неблагополучных пунктов, в которых выявляют более 1,2 млн. особей, зараженных вирусом лейкоза крупного рогатого скота, из них до 100 тыс. – в гематологической стадии лейкоза (П.Н. Смирнов с соавт., 1992; М.И. Гулюкин с соавт., 2002, 2005; Ю.П. Смирнов с соавт., 2008).

Изучение иммунологических аспектов при инфекции ВЛКРС и лейкозе крупного рогатого скота остается весьма актуальной проблемой ветеринарной лейкологии и необходимо для объективной оценки при проведении диагностических исследований на лейкоз.

Не вызывает сомнения тот факт, что возникновение нарушений функций иммунной системы является одним из патогенетических механизмов при возникновении туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота. Однако при изучении иммунного статуса существенные изменения уровней иммунологических показателей отмечаются лишь у части больных, при этом по уровням отдельных параметров какие-либо закономерные нарушения в иммунной системе выявить не удастся. Контроль за изменениями может осуществляться с помощью математического моделирования состояний, сущность которого состоит в том, что в системе выделяются несколько доминирующих для того или иного состояния компонентов и создают на их основе математическую модель, которая представляет собой уравнение или систему уравнений, связывающие несколько показателей в единое целое (Г.И. Марчук, Р.В. Петров, 1982; Г.И. Марчук, Л.Н. Бельх, 1986). В настоящее время имеются различные подходы по созданию интегральных показателей иммунного статуса и методов прогнозирования заболевания.

Поскольку в основе функционирования любой системы лежат связи между ее компонентами, для изучения иммунной системы Р.В. Петровым с соавт. (1983) был предложен дискретно-динамический подход, базирующийся на оценке иммунного статуса с позиции взаимосвязей между параметрами.

В последующем на основе выявленных сочетаний параметров с различными взаимосвязями в иммунной системе, составляют дифференциально-прогностические таблицы, с помощью которых прогнозируют формирование протективного иммунитета или патологии (М.А. Бажин, 1995).

Создание таких таблиц и в целом комплексное многоплановое исследование иммунного статуса крупного рогатого скота при туберкулезе и лейкозе на основе взаимосвязей актуальны и полученные в этом плане новые знания могут быть использованы при оценке развития инфекционного процесса и прогноза течения заболевания.

Цель и задачи исследования. Цель исследований состояла в оптимизации существующих и разработке новых методов контроля и коррекции иммунного статуса при туберкулезе и лейкозе крупного рогатого скота.

Для достижения намеченной цели были определены следующие задачи:

- разработать способ оценки иммунного статуса привитых животных, объективно отражающий состояние клеточного иммунитета;
- оценить противотуберкулезный иммунитет на основе взаимосвязей в системе иммунитета здоровых, вакцинированных БЦЖ, реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих и больных туберкулезом животных;

- разработать систему иммунной защиты крупного рогатого скота от туберкулеза с применением БЦЖ и молекулярной вакцины ТБЦ-2;
- разработать технологию изготовления специфического иммуномодулирующего средства на основе антигенов микобактерий вакцинного штамма БЦЖ и полиэлектролитов и определить его протективные свойства в опытах на лабораторных животных и крупном рогатом скоте;
- разработать приемлемые для практического использования методы оценки иммунного статуса у крупного рогатого скота при лейкозе.

Связь исследований с научной программой. Диссертация выполнена в соответствии с тематическими планами НИР ВНИИБТЖ 02.01.08. «Разработать новые методы иммунологической защиты животных на основе применения молекулярных препаратов и методов оценки иммунологических феноменов» (2000-2005 гг.); 08.01.04. «Создать систему иммунной защиты крупного рогатого скота от туберкулеза с применением молекулярных вакцин. Выявить молекулярно-генетические аспекты паразитозооценоза при туберкулезе животных и обосновать ускоренную диагностику с учетом изменчивости свойств возбудителя» (2006-2010 гг.); 08.01.05. «Провести сравнительную оценку существующих и новых методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота и усовершенствовать противолейкозные мероприятия» (2006-2010 гг.).

Научная новизна и теоретическая значимость. Впервые были изучены взаимосвязи между иммунологическими показателями (количеством нейтрофилов, основных форм лимфоцитов и их функциональной активностью) у здоровых, вакцинированных БЦЖ, реагирующих на ППД-туберкулин для молокопитающих и больных туберкулезом животных. На основании проведенного иммунологического исследования с помощью дискретно-динамического метода математического анализа был разработан способ оценки иммунитета у вакцинированного молодняка крупного рогатого скота.

Модифицирована оценка функциональной активности нейтрофилов в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), за счет ускоренного метода визуализации. Предлагаемый способ позволяет уменьшить объем исследования крови, материальные затраты, повышает точность, а также дает возможность одновременно провести подсчет общего количества лейкоцитов.

Впервые разработаны условия применения белково-целлюлозного комплекса ТБЦ-2 в сочетании с БЦЖ на крупном рогатом скоте и дана оценка иммунного статуса животных на основе взаимосвязей в системе иммунитета.

Предлагаемая система иммунной защиты крупного рогатого скота от туберкулеза позволяет создавать у животных перманентный протективный иммунитет, что уменьшит сроки оздоровления ферм и снизит риск реинфекции в оздоровленных стадах.

Разработан способ оценки иммуномодулирующих препаратов, позволяющий тестировать способность известных или новых иммуномодулирующих средств восстанавливать утраченную иммунологическую реактивность. Научная новизна разработки заключается в экспериментальной индукции иммунологической толерантности у морских свинок ППД-туберкулином и восстановление утраченной реактивности с помощью изучаемых иммуномодуляторов.

Это достигается за счет последующей иммунизации животных вакциной БЦЖ, затем экспериментального заражения вирулентной культурой микобактерий и на основе патологоанатомических исследований оценке препарата.

Разработана технология получения протективных специфических средств микробного происхождения из комплекса антигенов разрушенной культуры БЦЖ и не природных полиэлектролитов. Установлено, что наиболее перспективным конъюгатом является составленный на основе комплекса антигенов разрушенной культуры БЦЖ, инкубированный с формалином, и конъюгированный с ПВП в соотношении 1 мг/мл белка комплекса антигенов и 600 мг ПВП.

Разработанная технология изготовления специфического иммуномодулятора позволяет создавать препараты, способные восстанавливать у морских свинок утраченную иммунологическую реактивность и усиливать протективные свойства вакцины БЦЖ.

Впервые изучены взаимосвязи у потомства, полученного от здоровых и коров-матерей, носителей ВЛКРС, а также у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу между иммунологическими показателями.

Установлено, что наиболее стабильным признаком в иммунной системе у инфицированного или больного лейкозом крупного рогатого скота, свидетельствующим об иммунной недостаточности, является изменение общего числа лимфоцитов и Т-лимфоцитов с рецептором к эритроцитам барана.

Научная новизна исследований подтверждена 6 патентами РФ и 1 решением о выдаче патента: «Способ оценки иммунитета привитого молодняка крупного рогатого скота» №2257913 от 10.08.2005; «Способ профилактики туберкулеза» №2266753 от 27.12.2005; «Способ оценки иммуномодулирующих препаратов» №2354401 от 10.05.2009; «Способ получения специфического иммуномодулятора» №2366455 от 10.09.2009; «Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота» №2379683 от 20.01.2010; «Способ оценки иммунного статуса крупного рогатого скота при лейкозе» №2408018 от 27 декабря 2010; «Способ определения функциональной активности нейтрофилов по реакции восстановления нитросинего тетразолия» (решение о выдаче патента на заявку №2009117416 от 5 мая 2010 г.).

Изобретению «Способ получения специфического иммуномодулятора» Отделом пищевой промышленности и биотехнологии Федерального института промышленной собственности (ФГУ ФИПС) дана высокая оценка, и оно внесено в базу «Перспективные изобретения». Информация о разработке опубликована в журнале Интеллектуальная собственность (промышленная собственность). – 2010. – №5. – С. 67.

Результаты исследований вносят существенный вклад в теорию функционирования иммунной системы во взаимосвязи параметров ее составляющих и более глубокое понимание сущности иммуно- и патогенеза туберкулеза и лейкоза животных. Полученные данные могут быть использованы не только в научно-исследовательской работе, но и в учебном процессе вузов.

Практическая значимость и внедрение результатов исследований.

Результаты научных исследований использованы для разработки методических рекомендаций, утвержденных на федеральном и региональном уровнях:

- по дискретно-динамическому анализу в оценке иммунитета;
- по методам оценки противотуберкулезного иммунитета у крупного рогатого скота на основе взаимосвязей в системе иммунитета;
- по системе противозoonотических мероприятий по профилактике и ликвидации хронических болезней животных;
- по оценке иммуномодулирующих свойств препаратов на их способность восстанавливать утраченную иммунологическую реактивность;
- по оценке иммунного статуса у крупного рогатого скота при лейкозе.

Материалы по разработке системы иммунной защиты крупного рогатого скота от туберкулеза с применением БЦЖ и молекулярной вакцины ТБЦ-2, рассмотрены и одобрены НТС Главного управления сельского хозяйства администрации Омской области, протокол №6 от 29.11.2002 г.

Разработаны технические условия, временное наставление по применению специфического иммуномодулятора микробного происхождения (КИМ-М), временный регламент по изготовлению лабораторного образца иммуномодулирующего средства (2010 г.).

Основные теоретические положения и экспериментальные данные, изложенные в диссертационной работе и монографии «Иммунология, микробиология, эпизоотология бруцеллеза и туберкулеза животных», используются в программах обучения студентов по курсам микробиологии, иммунологии и патофизиологии на факультете ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «Уральская государственная сельскохозяйственная академия»; по курсам микробиологии, иммунологии и эпизоотологии в Институте биотехнологии и ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «Тюменская государственная сельскохозяйственная академия».

Получены: золотая медаль «Innovations for investments to the future» «Центра Международного Делового Сотрудничества» Американско-Российского Делового Союза (ARBU) за «Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота» (2010 г.); медаль «Лауреат конкурса Золотой микроскоп» за монографию «Иммунология, микробиология, эпизоотология бруцеллеза и туберкулеза животных» (2007 г.).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Методы оценки иммунного статуса молодняка крупного рогатого скота, привитого вакциной БЦЖ;
2. Материалы по изучению взаимосвязей в системе иммунитета у здоровых, вакцинированных БЦЖ, реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих и больных туберкулезом животных;
3. Особенности системы иммунной защиты крупного рогатого скота от туберкулеза с последовательным применением живой вакцины БЦЖ и молекулярной ТБЦ-2;
4. Технология изготовления специфического иммуномодулятора и степень его влияния на иммунный статус лабораторных животных и молодняка крупного рогатого скота;
5. Методы оценки иммунного статуса у крупного рогатого скота инфицированного ВЛКРС и больного лейкозом.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета Всероссийского научно-исследовательского института бруцеллеза и туберкулеза животных (Омск, 2000-2010), Всероссийской научной конференции по проблемам хронических инфекций (Омск, 2001), научно-практической конференции ОмГАУ (2001), Международной научной конференции посвященной 175-летию аграрной науки Сибири «Эпизоотология диагностика и профилактика хронических инфекционных болезней животных» (Омск, 2003), Международной научной конференции «Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных» (Москва, 2003), Международной научно-практической конференции посвященной 35-летию СО РАСХН «Эпизоотология, патология и ветеринарно-санитарные мероприятия при инфекционных болезнях животных» (Омск, 2004), Международной научно-практической конференции посвященной 100-летию со дня рождения И.Г. Кондюрин «Актуальные вопросы микробиологии и инфекционной патологии животных» (Омск, 2004), 4-й межрегиональной научно-практической конференции посвященной 100-летию со дня рождения И.В. Окунцова «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» (Омск, 2005), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы обеспечения ветеринарного благополучия животноводства» (Ялта, 2005), Международном научно-практическом конгрессе «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» (Санкт-Петербург, 2005), Международном симпозиуме, посвященном 45-летию образования ФГУ ФЦТРБ – ВНИВИ «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний» (Казань, 2005), научно-практической конференции, посвященной 75-летию кафедр инфекционных болезней взрослых и детей ОмГМА «Актуальные вопросы инфекционной патологии» (Омск, 2005), 5-й межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины продуктивных и непродуктивных животных» (Омск, 2006), 6-й межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 85-летию СибНИВИ-ВНИИБТЖ «Патология сельскохозяйственных животных и пути ее профилактики» (Омск, 2007), межрегиональной научно-практической конференции «Дни иммунологии в Сибири» (Омск, 2007), 7-й межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 180-летию аграрной науки Сибири «Диагностика, лечение и профилактика болезней животных в условиях Сибири и Урала» (Омск, 2008), XI-й Международной научно-практической конференции «Развитие АПК Азиатских территорий» (Новосибирск, 2008), Всероссийской научно-практической конференции «Современные проблемы диагностики и профилактики хронических зооантропонозных инфекций» (Омск, 2009), 8-й межрегиональной научно-практической конференции «Патология продуктивных и непродуктивных животных, рыб и птиц» (Омск, 2009), X Международной научно-практической конференции, посвященной памяти А.В. Копырина «Актуальные проблемы инфекционных и незаразных патологий животных» (Омск, 2010), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы инновационного развития ветеринарной науки и практики» (Алматы, 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 48 научных работ, в том числе 9 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ (журналы Ветеринарная патология – 3, Ветеринария и Кормление – 3, Сибирский вестник сельскохозяйственной науки – 2, Достижения науки и техники АПК – 1), монография, методические рекомендации и патенты РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 279 страницах, иллюстрирована 62 таблицами, 11 рисунками. Включает обзор литературы, материал и методы исследования, собственные исследования, обсуждение результатов исследования, заключение, выводы, практические предложения, список литературы, содержащий 456 источников, в том числе 90 иностранных авторов, приложение.

Личный вклад соискателя. Работа выполнена соискателем самостоятельно, участие соавторов отражено в совместно изданных научных статьях. В выполнении отдельных этапов работы принимали участие: к.б.н. Ю.И. Пацула, к.в.н. А.Н. Новиков, сотрудники ВНИИБТЖ Т.С. Дудолодова, Е.М. Шулико.

Автор приносит глубокую благодарность за оказание научно-методической помощи научному консультанту д.в.н., профессору М.А. Бажину, директору ВНИИБТЖ заслуженному деятелю науки РФ, д.в.н., профессору В.Г. Ощепкову, за научное руководство в аспирантуре д.в.н. Н.А. Донченко.

2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в отделе проблем туберкулеза Всероссийского научно-исследовательского института бруцеллеза и туберкулеза животных секторе иммунитета и специфической профилактики туберкулеза и в хозяйствах Омской и Новосибирской областей в период 2000-2010 гг.

Объектом исследования являлись 10 тыс. гол. крупного рогатого скота разного возраста и пола, периферическая кровь и сыворотка крови 968 гол. молодняка крупного рогатого скота, нетелей и коров из благополучных и неблагополучных по туберкулезу хозяйств, а также из неблагополучных по лейкозу хозяйств. В опытах с заражением культурой возбудителя бычьего вида использовано 189 морских свинок массой 350-400 г.

Лабораторных животных содержали в условиях вивария, кормление осуществляли согласно нормам рациона для лабораторных животных (Г.Е. Батрак, А.М. Кудрин, 1979). За подопытными животными вели постоянное наблюдение, в опыт брали только клинически здоровых животных. Для экспериментального заражения лабораторных животных использовали микобактерии вирулентного штамма 14 M. bovis. При анализе протективных свойств противотуберкулезных препаратов на морских свинках применяли метод С.И. Гельберг, Е.А. Финкель (1959), для оценки напряженности иммунитета использовали индекс защиты, предложенный А.И. Тогуновой (1951).

Иммунизацию животных осуществляли вакциной БЦЖ и белково-целлюлозным комплексом ТБЦ-2, приготовленным по методу М.А. Бажина с соавт. (2003). В эксперименте на морских свинках были использованы иммунокорректоры различных классов: левамизол, полиоксидоний, ронколейкин, поливинилпирролидон, тималин в дозах, соответствующих инструкции по их

применению. Аллергические исследования проводили ППД-туберкулином для млекопитающих производства Курской биофабрики.

Комплекс антигенов для конъюгации с полиэлектролитами выделяли из вакцинного штамма БЦЖ, разрушенного ультразвуком на аппарате УЗДН-1 (22-35 кГц, 60-70 Вт/см² в течение 30 мин), полученную взвесь центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли содержание белка, способом, основанным на использовании красителя бромфенолового синего (Е.В. Лехтцинд, Д.А. Эльгорт, 1987). В объем антигенного комплекса добавляли 37%-ный или 40%-ный медицинский формальдегид, затем реакционную смесь инкубировали в термостате при 37° С и конъюгировали с поливинилпирролидоном.

Число Т-лимфоцитов определяли с помощью спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-рок); Т-киллеров – непрямого глобулинового розеткообразования с эритроцитами быка (ЕА-рок); Т-антиген-реактивных лимфоцитов – туберкулинового розеткообразования с эритроцитами быка, адсорбированными ППД-туберкулин (ЕТ-рок); Т-антиген-реактивных лимфоцитов к вирусу лейкоза крупного рогатого скота с эритроцитами быка, адсорбированными антигеном вируса лейкоза (ЕАГ-рок); В-лимфоцитов – комплементарного розеткообразования с эритроцитами быка (Г.Ф. Коромыслов с соавт., 1980; М.А. Бажин с соавт., 1989). Уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) методом осаждения полиэтиленгликолем (ПЭГ) с молекулярной массой 6000 (Ю.А. Гриневиц, А.Н. Алферов, 1981). Функциональное состояние нейтрофилов оценивали в тесте с нитросиним тетразолием (НСТ) визуальным цитохимическим методом (В.Г. Савватеева, А.В. Кочкин, 1988) в нашей модификации, а также фотометрическим методом в спонтанном без нагрузки и стимулированном с использованием вакцины БЦЖ с последующим подсчетом коэффициента стимуляции К ст. (К ст. НСТ = оптическая плотность в стимулированных лунках / оптическая плотность в лунках без стимуляции) (М.А. Годков, В.Ю. Зинкин, 2003). Постановку реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) проводили по E. Bloemense et al. (1989) с использованием микрокультур цельной крови с ППД-туберкулином и ФГА без выделения лимфоцитов. Окраску мазков крови, подсчет лейкоцитов и выведение лейкоцитарной формулы проводили по общепринятым методикам.

Для выявления серопозитивных животных – носителей вируса лейкоза крупного рогатого скота применяли реакцию иммунодиффузии (РИД) в соответствии с Методическими указаниями по диагностике лейкоза крупного рогатого скота, утвержденными ДВ МСХ РФ (М., 2000).

Серологические исследования (РИД, ЦИК) проведены на поголовье крупного рогатого скота разных возрастных групп из благополучных и неблагополучных по лейкозу хозяйств. Всего исследовано 458 животных. Для выявления лейкоза животных применяли гематологический метод исследования. Лейкоформулу определяли при помощи микроскопирования мазков крови. Показатель абсолютного количества лимфоцитов оценивали по «лейкозному ключу» (Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота, М., 2000).

Биометрическую обработку цифрового материала экспериментальных исследований проводили с помощью программы одно- и многофакторного корре-

ляционного и регрессионного анализов, составленной на основе данных В.Ю. Урбаха (1964), А.Т. Усовича, П.Т. Лебедева (1970), а также одним из вариантов регрессионного метода – дискретно-динамическим анализом. Для оценки существенности различий между двумя средними величинами M_x и M_y использовали t -критерий по Стьюденту.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Оценка иммунного статуса животных

3.1.1 Разработка принципов и критериев оценки иммунного статуса у животных на основе дискретно-динамического анализа

Для оценки иммунного статуса 20-ти гол. молодняка крупного рогатого скота в возрасте 15-17 мес., привитого вакциной БЦЖ месяцем ранее, определили число иммунокомпетентных клеток в абсолютном содержании (тыс/мкл). Описание иммунного статуса привитого молодняка крупного рогатого скота 15-17-ти месячного возраста проводили в сравнении с непривитыми животными этой же возрастной группы (30 гол.).

Установлено, что у молодняка, привитого БЦЖ, по отношению к интактным животным происходит снижение количества всех иммунокомпетентных клеток, однако достоверного различия достигает лишь изменение числа Т-лимфоцитов ($1,53 \pm 0,18$, $2,35 \pm 0,10$; $P < 0,001$). Изменения только в количестве иммунокомпетентных клеток, вызванные введением БЦЖ, не позволяют объективно оценить эффективность вакцинации у животных, поэтому были исследованы корреляционные связи клеточно-иммунологических показателей.

Корреляционные связи у привитого БЦЖ молодняка крупного рогатого скота усиливаются и характеризуются как прямые тесные, тогда как у интактного молодняка они либо прямые средние, либо прямые и обратные слабые.

Несмотря на получение новых сведений, достичь цели по оценке иммунитета, определяя только корреляционные связи, у животных не представилось возможным. Поэтому для решения поставленной задачи провели дискретно-динамический анализ иммунологических параметров. По условию метода животных, привитых БЦЖ, разделили на 3 приблизительно равные группы по значениям базисного параметра (Т-лимфоциты): 1 – с минимальными значениями базисного параметра, 2 – с максимальными значениями и 3 – со средними (в дальнейшем не учитывалась). В 1 и 2 группах рассчитали средние значения остальных (вариабельных) параметров и с помощью вариационной статистики изучили достоверность их различий. В случаях, когда средние значения вариабельного параметра в группах с минимальными и максимальными значениями базисного параметра достоверно ($P < 0,05$) различаются, констатируют наличие взаимосвязей между ними. Взаимосвязь положительна, если при увеличении базисного параметра уровень вариабельного также увеличивается; отрицательна, если при увеличении базисного параметра уровень вариабельного снижается. При этом каждый из изучаемых параметров брали в качестве базисного, в которых вели подобный анализ с помощью вариационной статистики. Аналогичному анализу были подвергнуты иммунологические параметры интактного молодняка крупного рогатого скота.

Изучение фрагментов иммунной системы в большинстве случаев при выявлении сочетаний параметров с высокой степенью достоверности дает возможность дифференцированно описать иммунный статус опытных животных.

Результаты оценки иммунного статуса животных опытных групп с использованием дискретно-динамического анализа показали, что вакцина БЦЖ в иммунной системе молодняка крупного рогатого скота усиливает взаимосвязи иммунологических параметров и увеличивает число сочетаний.

С целью автоматизации и исключения субъективизма дискретно-динамического анализа была разработана программа для ПК. Программа помогает разделить исследуемых животных на подгруппы с минимальным и максимальным значением параметров с установкой стабильности границ базиса, а затем провести статистическую обработку цифрового материала в подгруппах, отобрать значимые сочетания параметров по t-критерию Стьюдента и построить дифференциально-прогностические таблицы. Эти таблицы позволяют оценить участие отдельных иммунокомпетентных клеток в противотуберкулезном иммунитете или пригодность тех или других методов для определения клеточного иммунитета.

На основании выявленных достоверно различающихся ($P \leq 0,05$) значимых сочетаний параметров с помощью компьютерной программы составили дифференциально-прогностическую таблицу (табл. 1).

Таблица 1. – Дифференциально-прогностическая таблица по оценке иммунного статуса у интактного и привитого БЦЖ молодняка крупного рогатого скота, в возрасте 15-17 мес., тыс./мкл

| № п/п | Сочетание: базис (вариабельный параметр) | n | t – критерий по Стьуденту | базис | вариабельный |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----|---------------------------|-------------|--------------|
| <i>Интактные</i> | | | | | |
| 1 | T-киллеры (T-антиген-реактивные лимфоциты) | 30 | 2,95 | $\leq 1,28$ | $\leq 0,87$ |
| 2 | T-антиген-реактивные лимфоциты (T-киллеры) | | 2,60 | $\leq 1,13$ | $\leq 1,47$ |
| Количество животных с высокой активностью иммунокомпетентных клеток | | 7 | 23,33% | | |
| <i>Привитые БЦЖ</i> | | | | | |
| 1 | В-лимфоциты (нейтрофилы) | 20 | 3,53 | $\geq 1,40$ | $\geq 1,22$ |
| 2 | В-лимфоциты (T-киллеры) | | 3,06 | $\geq 1,40$ | $\geq 1,66$ |
| 3 | T-киллеры (нейтрофилы) | | 2,77 | $\geq 1,50$ | $\geq 1,88$ |
| 4 | T-лимфоциты (T-киллеры) | | 2,76 | $\leq 1,09$ | $\leq 0,99$ |
| 5 | T-антиген-реактивные лимфоциты (T-киллеры) | | 2,72 | $\leq 0,69$ | $\leq 0,99$ |
| 6 | T-лимфоциты (нейтрофилы) | | 2,60 | $\leq 1,09$ | $\leq 0,96$ |
| 7 | T-антиген-реактивные лимфоциты (нейтрофилы) | | 2,55 | $\leq 0,69$ | $\leq 0,96$ |
| 8 | В-лимфоциты (T-лимфоциты) | | 2,41 | $\geq 1,40$ | $\geq 2,10$ |
| Количество животных с высокой активностью иммунокомпетентных клеток | | 14 | 70 % | | |

В дифференциально-прогностической таблице по оценке иммунного статуса у интактного молодняка установлено 2 значимых сочетания параметров (табл. 1). Так, Т-киллеры, как в качестве базисного, так и в качестве переменного параметра с высокой степенью достоверности взаимосвязаны с Т-антиген-реактивными лимфоцитами.

Число значимых сочетаний у привитых БЦЖ животных увеличивается до 8 по сравнению с интактными. Изучение числа связей каждого определяемого показателя с другими позволило установить, что наибольшим их числом обладают Т-киллеры (1 раз в качестве базисного и 3 раза в качестве переменного) и нейтрофилы (4 раза в качестве переменного), наименьшим числом - Т-антиген-реактивные лимфоциты (2). Это свидетельствует о функциональном напряжении иммунной системы за счёт потребности подключения большего количества взаимосвязей её структурных компонентов по сравнению с интактными животными.

В дальнейшем, используя значения базисного и переменного параметров таблицы, оценивали каждого животного исследуемой группы по всем значимым сочетаниям параметров. Если показатели числа иммунокомпетентных клеток животного соответствуют хотя бы одному из сочетаний (базисного, переменного) таблицы, такие животные признаются с высокой активностью иммунокомпетентных клеток. В этом случае животные могут противостоять естественному заражению возбудителем туберкулеза в условиях неблагополучной фермы. Таким способом проводили отбор животных по всем сочетаниям параметров и определили 14 животных (70 %) с высокой активностью иммунокомпетентных клеток в условиях неблагополучной по туберкулезу крупного рогатого скота ферме.

Проводя подобный анализ дифференциально-прогностической таблицы по оценке иммунитета у интактных животных, было установлено 23,33% животных с высокой активностью иммунокомпетентных клеток.

По результатам исследований можно заключить, что иммунизация вакциной БЦЖ усиливает взаимосвязи иммунологических параметров в иммунной системе молодняка крупного рогатого скота и увеличивает число сочетаний. Метод дискретно-динамического анализа и разработанная на его основе дифференциально-прогностическая таблица позволяет установить значимые ($P \leq 0,05$) сочетания показателей активности клеток крови, указывающих на уровень противотуберкулезного иммунитета у привитых животных.

3.2 Оценка противотуберкулезного иммунитета

3.2.1 Иммунный статус у интактных и инфицированных *M. bovis* морских свинок

С целью оценки иммунного статуса в крови 20-ти интактных морских свинок и 20-ти через 30 суток после инфицирования *M. bovis* шт. 14 в дозе 0,0001 мг определили число иммунокомпетентных клеток в абсолютном содержании (тыс/мкл), функциональную активность лимфоцитов в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) в спонтанном и стимулированном ППД-

туберкулином для млекопитающих и фитогемагглютинином (ФГА) вариантах (имп/мин) и функциональную активность нейтрофилов в тесте с нитросиним тетразолием (НСТ) в спонтанном и стимулированном ППД-туберкулином для млекопитающих и БЦЖ вариантах в %.

Анализируя средние значения иммунологических параметров, установили, что у морских свинок, инфицированных *M. bovis*, отмечено достоверное увеличение количества иммунокомпетентных клеток, за исключением Т-лимфоцитов, число которых уменьшается.

По результатам исследования в РБТЛ отмечено, что у животных, инфицированных *M. bovis*, была выражена пролиферация лимфоцитов на ППД-туберкулин и ФГА (РБТЛ_{ППД}, РБТЛ_{ФГА}), а также установлено увеличение уровня спонтанного синтеза ДНК лимфоцитов (РБТЛ_{спонт.}).

Уровень функциональной активности нейтрофилов у морских свинок, инфицированных *M. bovis*, также увеличивался, как в спонтанном варианте (НСТ_{спонт.}), так и после стимуляции ППД-туберкулином и БЦЖ (НСТ_{ППД}, НСТ_{БЦЖ}).

Затем, исследовав корреляционные связи иммунологических параметров, у интактных морских свинок выявили 1 тесную корреляционную связь между РБТЛ_{спонт.} и РБТЛ_{ППД} ($r=0,79$). Также отметили 11 прямых и обратных связей средней силы и 43 слабой силы из 55-ти возможных. У инфицированных животных определили тесные корреляционные связи между числом Т-киллеров и В-лимфоцитов, числом В-лимфоцитов и Т-антиген-реактивных лимфоцитов, а также между НСТ_{спонт.} и НСТ_{ППД}.

Исследование опытных групп дискретно-динамическим анализом позволило установить, что у инфицированных животных возникает иммунопатология – иммунологический дисбаланс, характеризующийся резким изменением направления и интенсивности связей. Наиболее выраженное изменение направления и интенсивности связей между компонентами иммунной системы отмечалось при базисе НСТ_{ППД}, нейтрофилы, Т-лимфоциты и Т-киллеры.

Также установлено, что важнейшим критерием системы служит степень ее связанности, которая представляет собой число достоверных взаимосвязей между параметрами иммунной системы. Так, в состоянии нормы у интактных морских свинок уровень связанности компонентов иммунной системы достаточно низок, на что указывают только 3 достоверных пары сочетаний. Инфицирование морских свинок *M. bovis* приводит к изменению характера взаимосвязей (11 достоверных пар сочетаний).

Таким образом, каждое из состояний характеризовалось определенным типом связанности различных клеток периферической крови; характер такой связанности отражает особенности иммунной системы при различных состояниях организма.

В дальнейшем, используя дифференциально-прогностическую таблицу, составленную на основе выявленных с высокой степенью достоверности сочетаний, оценивали каждого животного. В результате было выявлено 25 % среди интактных животных и 5% среди инфицированных *M. bovis* с высокой активностью иммунокомпетентных клеток.

В итоге удалось выявить 19 из 20-ти (95%) морских свинок с низкой активностью иммунокомпетентных клеток (отсутствием иммунитета), что полностью подтвердилось последующим патологоанатомическим исследованием, с использованием схемы Г.И. Гельберга и Е.А. Финкель (1959). Так, степень пораженности внутренних органов у всех 19-ти животных варьировала от 8 до 9 баллов, в то время как у единственной морской свинки с высокой активностью иммунокомпетентных клеток этот показатель составил 6 баллов.

Таким образом, анализ дифференциально-прогностической таблицы позволяет утверждать, что иммунная система животных, инфицированных *M. bovis*, находится в состоянии функционального напряжения, которое приводит к потребности подключения большего количества взаимосвязей и снижению количества животных с высокой активностью иммунокомпетентных клеток. У интактных морских свинок число статистически достоверных взаимосвязей между параметрами находится на низком уровне.

3.2.2 Анализ взаимосвязей в системе иммунитета у молодняка крупного рогатого скота, привитого вакциной БЦЖ

Для изучения взаимосвязей иммунологических параметров в крови молодняка крупного рогатого скота, привитого вакциной БЦЖ в возрасте до 20-ти дней, в разные возрастные периоды (у 20-ти животных в возрасте 4-5 мес., у 20-ти животных в возрасте 9-11 мес. и 20-ти в возрасте 15-17 мес.) определили число иммунокомпетентных клеток в абсолютном содержании (тыс/мкл).

Содержание всех иммунокомпетентных клеток у животных к 9-11-ти месячному возрасту по отношению к количеству у телят в возрасте 4-5-ти мес. увеличивается, однако достоверных изменений ($P < 0,05$) достигает только число Т-киллеров, В-лимфоцитов и Т-антиген-реактивных лимфоцитов. У животных в возрасте 15-17 мес. наблюдается с высокой степенью достоверности увеличение числа Т-лимфоцитов, Т-киллеров и В-лимфоцитов.

Затем исследовали корреляционные связи иммунологических параметров у привитых телят и установили их ослабление к 15-17 мес.

Результаты исследований иммунной системы у привитого молодняка крупного рогатого скота с использованием дискретно-динамического анализа показали, что взаимосвязи обнаруживаются преимущественно у телят в возрасте 4-5 мес. (15 пар сочетаний), к 9-11-ти мес. их количество снижается (10 пар), а к 15-17-ти мес. отмечается дальнейшее снижение их числа (4 пары).

На основании выявленных со степенью достоверности ($P \leq 0,05$) значимых сочетаний параметров составили дифференциально-прогностические таблицы и оценивали каждого животного исследуемых групп по всем значимым сочетаниям параметров.

В результате анализа дифференциально-прогностических таблиц были выявлены из числа телят, привитых БЦЖ до 20-ти дней, в возрасте 4-5 мес. – 70% животных с высокой активностью иммунокомпетентных клеток, в возрасте 9-11 мес. – 50% и в возрасте 15-17 мес. – 30%.

Следовательно, анализ дифференциально-прогностических таблиц подтвердил, что у молодняка крупного рогатого скота в возрасте 15-17 мес., привитого

вакциной БЦЖ в раннем возрасте, количество статистически достоверных взаимосвязей между параметрами находится на низком уровне (спокойное функционирование иммунной системы). У животных до 9-11-месячного возраста иммунная система находится в состоянии функционального напряжения (активной работы), о чем свидетельствует высокий уровень числа взаимосвязей.

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

Провели сравнительное изучение иммунного статуса крупного рогатого скота реагирующего на ППД-туберкулин для млекопитающих (ЗАО «Азовское» Азовского района, благополучное по туберкулезу крупного рогатого скота, при контрольно-диагностическом убое туберкулеза не установлено, а при бактериологическом исследовании биоматериала выделены культуры атипичных микобактерий), привитого вакциной БЦЖ (через 8 мес. после вакцинации) (ОПХ СибМИС «Сосновское» Таврического района, благополучное по туберкулезу крупного рогатого скота) и реагирующих на ППД-туберкулин (ООО «Алексеевское» Горьковского района, неблагополучное по туберкулезу, у большинства животных при контрольно-диагностическом убое обнаружены изменения характерные для туберкулеза). Описание иммунного статуса коров опытных групп проводили в сравнении с нереагирующими на ППД-туберкулин из благополучного хозяйства ЗАО «Азовское» Азовского района (контроль).

Определили число иммунокомпетентных клеток в абсолютном содержании (тыс/мкл), функциональную активность лимфоцитов в РБТЛ в спонтанном и стимулированном ФГА вариантах (имп/мин) и функциональную активность нейтрофилов в тесте с нитросиним тетразолием в спонтанном и стимулированном БЦЖ вариантах в %.

Анализ числа иммунокомпетентных клеток в периферической крови показал, что у привитых БЦЖ коров по сравнению с нереагирующими на ППД-туберкулин коровами с высокой степенью достоверности увеличивается количество Т-, В-лимфоцитов, Т-киллеров и Т-антиген-реактивных лимфоцитов, а также выражена пролиферация лимфоцитов на ФГА. Содержание нейтрофилов и уровень функциональной активности нейтрофилов в спонтанном и стимулированном БЦЖ вариантах достоверно уменьшается.

У животных из благополучного хозяйства, реагирующих на ППД-туберкулин, по сравнению с контролем наблюдается уменьшение числа нейтрофилов и Т-лимфоцитов (соответственно: $P < 0,05$; $P < 0,01$), а также уровня пролиферации лимфоцитов на ФГА и уровня функциональной активности нейтрофилов в спонтанном и стимулированном БЦЖ вариантах.

Отмечено достоверное увеличение числа Т-киллеров и В-лимфоцитов и уменьшение числа нейтрофилов у реагирующих на ППД-туберкулин коров из неблагополучного хозяйства по отношению к нереагирующим. По результатам исследования в РБТЛ и НСТ-тесте установили уменьшение уровня спонтанного синтеза ДНК лимфоцитов и пролиферации лимфоцитов на ФГА (РБТЛ_{спонт.},

РБТЛ_{ФГА}) и уровня функциональной активности нейтрофилов в спонтанном и стимулированном БЦЖ вариантах (НСТ_{СПОНТ.}, НСТ_{БЦЖ}).

Дискретно-динамический анализ позволил отметить, что трансформация уровней переменных параметров в подгруппах с максимальными и минимальными значениями базисных у коров опытных групп по сравнению с нереагирующими на ППД-туберкулин животными сопровождается изменением интенсивности и направления взаимосвязи с отрицательными на положительные, а также с положительными на отрицательные. Причем интенсивность взаимосвязей наиболее выражена у животных, реагирующих на ППД-туберкулин, из неблагополучного хозяйства, чуть слабее у привитых БЦЖ и наименее – у реагирующих на ППД-туберкулин из благополучного хозяйства.

Также установлено, что у нереагирующего на туберкулин крупного рогатого скота количество статистически достоверных взаимосвязей между показателями клеточного иммунитета находится на низком уровне. У коров, привитых вакциной БЦЖ и реагирующих на ППД-туберкулин, иммунная система находится в состоянии функционального напряжения, в результате чего повышается количество взаимосвязей.

В дальнейшем, с помощью дифференциально-прогностических таблиц оценивали каждого животного исследуемых групп по всем значимым сочетаниям параметров. В результате выявлено из числа коров, нереагирующих на ППД-туберкулин 15 % животных с высокой активностью иммунокомпетентных клеток, из числа привитых БЦЖ – 75 %, из числа реагирующих на туберкулин из благополучного хозяйства – 50 % и из числа реагирующих на туберкулин из неблагополучного хозяйства – 40 %. Среди 13-ти животных, реагирующих на ППД-туберкулин из неблагополучного хозяйства, у которых при патологоанатомическом исследовании установлены изменения туберкулезного характера, 3 (23 %) оказались в числе с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток, а у других 10-ти (77 %) активность иммунокомпетентных клеток была крайне низкой.

Значительная численность животных с высокой активностью иммунокомпетентных клеток среди реагирующих на туберкулин из благополучного хозяйства, связана с персистенцией у животных атипичных микобактерий, которые создают иммунитет определенной силы.

Таким образом, вакцина БЦЖ в иммунной системе крупного рогатого скота усиливает взаимосвязи иммунологических параметров и увеличивает число их сочетаний. Увеличение числа значимых сочетаний у реагирующих коров из благополучного хозяйства обусловлено адаптационной перестройкой в иммунной системе, связанной с развитием туберкулеза.

3.3 Разработка системы иммунной защиты крупного рогатого скота от туберкулеза с применением БЦЖ и молекулярной вакцины ТБЦ-2

В настоящее время необходимость использования протективных экологически безопасных бесклеточных вакцин против инфекционных болезней является общепризнанной. Наиболее перспективной концепцией конструирования таких вакцин может быть конъюгация иммуногенной фракции, выделенной из

вакцинных бактерий, с матрицей, создающей в организме животного депо специфического иммуногена. Предполагается, что такой комплекс в системе иммунитета имитирует живую вакцину, способствует накоплению значительного количества клеток иммунной памяти, которые в последующем организуют защиту животного от возбудителя. Все это убедило нас о необходимости разработки системы иммунной защиты крупного рогатого скота с применением БЦЖ и молекулярной вакцины ТБЦ-2.

3.3.1 Реакции клеточного иммунитета у морских свинок, иммунизированных вакциной БЦЖ и белково-целлюлозным комплексом ТБЦ-2

Для изучения иммуномодулирующих свойств БЦЖ и белково-целлюлозного комплекса (ТБЦ-2) предварительно провели опыт на 15 морских свинках, которых разделили на 3 группы. 1-я группа – 5-ти морским свинкам ввели вакцину БЦЖ в дозе 0,1 мг, 2-я группа – 5-ти морским свинкам инъецировали подкожно белково-целлюлозный комплекс в дозе 125 мкг белка, 3-я – контрольная. Через 60 суток после вакцинации животных всех групп заразили подкожно *M.bovis* штамма 14 в дозе 0,0001 мг. Через 30 суток после заражения морских свинок усыпили ингаляционным наркозом для проведения патологоанатомического исследования, используя схему Г.И. Гельберга, Е.А. Финкеля (1959). Кровь у морских свинок брали до и на 30, 60 сутки после вакцинации, а также на 15 и 30 сутки после заражения.

В периферической крови морских свинок определили число иммунокомпетентных клеток в абсолютном содержании (тыс/мкл), функциональную активность лимфоцитов в реакции бласттрансформации лимфоцитов (имп/мин) в спонтанном и стимулированном ППД-туберкулином для млекопитающих и ФГА вариантах, а также функциональную активность нейтрофилов в тесте с нитросиним тетразолием в спонтанном и стимулированном БЦЖ вариантах.

Инокуляция препарата в организм экспериментальных животных вызывает комплекс иммунологических реакций, которые не имеют существенных различий с клеточными реакциями на вакцинацию БЦЖ. Так, введение БЦЖ и белково-целлюлозного комплекса ТБЦ-2 у морских свинок по сравнению с контрольной группой характеризуется резким снижением в периферической крови животных числа наиболее активных иммунокомпетентных клеток (Т-, В-лимфоцитов, Т-киллеров), в то время как уровень пролиферации лимфоцитов на ППД-туберкулин и ФГА к 60-м суткам после вакцинации увеличивается.

Через 15 суток после заражения *M. bovis* в 1-й и 2-й группах отмечается увеличение числа нейтрофилов, Т-лимфоцитов и Т-антиген-реактивных лимфоцитов, уровня функциональной активности нейтрофилов в НСТ-тесте, стимулированном ППД-туберкулином и БЦЖ, уровня спонтанного синтеза ДНК лимфоцитов и пролиферации лимфоцитов на ППД-туберкулин, в то время как уровень пролиферации лимфоцитов на ФГА снижается.

Через 30 суток после заражения *M. bovis* в 1-й и 2-й группах наблюдается увеличение числа нейтрофилов, Т-киллеров, Т-антиген-реактивных лимфоцитов, уровня пролиферации лимфоцитов на ППД-туберкулин и ФГА, а также снижение уровня функциональной активности нейтрофилов в НСТ-тесте, стимулированном ППД-туберкулином.

Таким образом, вакцинация как БЦЖ, так и ТБЦ-2 в организме морских свинок вызывает комплекс сходных иммунологических реакций по типу воспалительной реакции.

При анализе результатов патологоанатомического исследования морских свинок определяли показатель интенсивности поражений, используя схему Г.И. Гельберга, Е.А. Финкеля (1959), а для оценки напряженности иммунитета применяли индекс защиты, предложенный А.И. Тогуновой (1951).

Показатель интенсивности туберкулезных поражений у морских свинок в 1-й и 2-й группах соответственно равен $1,20 \pm 0,73$; $3,80 \pm 0,49$, тогда как в контрольной группе он составил $7,40 \pm 0,60$, т.е. в 6 раз больше, чем в группе, привитых БЦЖ и в 1,9 раза больше, чем в группе привитых ТБЦ-2.

Белково-целлюлозный комплекс ТБЦ-2 обладает протективными свойствами, но более низкими, чем у вакцины БЦЖ. Так, индекс защиты у морских свинок в 2-ой группе равен 48 %, тогда как во 1-ой группе он составил 84 %.

3.3.2 Взаимосвязи в системе иммунитета у морских свинок, иммунизированных вакциной БЦЖ и белково-целлюлозным комплексом ТБЦ-2

С целью оценки иммунного статуса с помощью дискретно-динамического анализа в крови 20-ти морских свинок до вакцинации, 20-ти - через 60 суток после вакцинации БЦЖ, 20-ти - через 60 суток после введения ТБЦ-2, 20-ти - через 30 суток после инфицирования *M. bovis*, иммунизированных БЦЖ, и 20-ти - через 30 суток после инфицирования *M. bovis*, иммунизированных ТБЦ-2, определили число иммунокомпетентных клеток в абсолютном содержании (тыс/мкл), функциональную активность лимфоцитов в реакции бласттрансформации лимфоцитов в спонтанном и стимулированном ППД-туберкулином для млекопитающих и фитогемагглютинином (ФГА) вариантах (имп/мин) и функциональную активность нейтрофилов в тесте с нитросиним тетразолием в спонтанном и стимулированном ППД-туберкулином для млекопитающих и БЦЖ вариантах в %.

Анализ средних значений иммунологических параметров показал, что у морских свинок, привитых БЦЖ, по сравнению с животными до вакцинации отмечается увеличение количества иммунокомпетентных клеток, кроме Т-антиген-реактивных лимфоцитов, концентрация в крови которых уменьшается, в то же время наблюдается достоверное ($P \leq 0,05$) снижение числа иммунокомпетентных клеток в крови морских свинок после введения ТБЦ-2, за исключением нейтрофилов, содержание в крови которых существенно не меняется.

По результатам исследования в РБТЛ отмечено, что у морских свинок, иммунизированных БЦЖ, была выражена пролиферация лимфоцитов на ППД-туберкулин и ФГА, а также установлено достоверное снижение уровня спонтанного синтеза ДНК лимфоцитов. У животных, вакцинированных ТБЦ-2, отмечено лишь достоверное снижение пролиферации лимфоцитов на ФГА.

У животных, инфицированных *M. bovis*, через 60 суток после иммунизации БЦЖ в сравнении с невакцинированными морскими свинками статистически значимых различий в числе иммунокомпетентных клеток не обнаружено. У морских свинок, инфицированных *M. bovis*, через 60 суток после иммунизации

ТБЦ-2 отмечено достоверное уменьшение количества В-лимфоцитов и Т-антиген-реактивных лимфоцитов, а также увеличение числа нейтрофилов.

По результатам исследования в РБТЛ и НСТ-тесте установлено увеличение уровня спонтанного синтеза ДНК лимфоцитов и пролиферации лимфоцитов на ППД-туберкулин для млекопитающих, достоверное увеличение уровня функциональной активности нейтрофилов в спонтанном и стимулированном ППД-туберкулином и БЦЖ вариантах, тогда как уровень пролиферации лимфоцитов на ФГА достоверно уменьшается.

На следующем этапе исследований провели дискретно-динамический анализ иммунологических параметров. Было проанализировано по 110 взаимосвязей между иммунологическими показателями в каждый срок исследования животных.

У морских свинок перед вакцинацией выявлено 8 достоверных взаимосвязей, вакцинированных БЦЖ – 14, иммунизированных ТБЦ-2 – 12, у инфицированных через 60 суток после введения БЦЖ – 14 и у инфицированных через 60 суток после иммунизации ТБЦ-2 – 11 пар сочетаний.

На основании выявленных со степенью достоверности ($P \leq 0,05$) значимых сочетаний параметров составили дифференциально-прогностические таблицы.

В дифференциально-прогностической таблице по оценке иммунного статуса у морских свинок перед иммунизацией представлено 8 значимых сочетаний параметров. Изучение числа связей каждого определяемого показателя с другими позволило установить, что наибольшей долей участия обладают Т-лимфоциты (2 раза в качестве базисного и 1 раз в качестве переменного параметров), наименьшей – В-лимфоциты, НСТ_{спонт.} и НСТ_{ппд} (по одному разу).

Адаптационная перестройка иммунной системы, вызванная иммунизацией БЦЖ, сопровождается увеличением числа значимых сочетаний по сравнению с группой животных перед вакцинацией, при этом наибольшим их количеством обладают также Т-лимфоциты (3 раза в качестве базисного и 2 раза в качестве переменного параметров), наименьшим – нейтрофилы и РБТЛ_{ппд} (по 1 разу). Это свидетельствует о функциональном напряжении иммунной системы за счёт потребности подключения большего количества взаимосвязей её структурных компонентов по сравнению со спокойным функционированием у морских свинок перед введением вакцинных препаратов.

Число значимых сочетаний у морских свинок, иммунизированных ТБЦ-2, по сравнению с интактными увеличивается до 12, что также свидетельствует о функциональном напряжении иммунной системы. Наибольшим числом стали обладать Т-киллеры и РБТЛ_{фга} (4).

Уровень сопряженности (связанности) компонентов иммунной системы у животных, инфицированных *M.bovis*, через 60 суток после вакцинации БЦЖ не изменяется и также составляет 14 значимых сочетаний. Наибольшую активность имеют В-лимфоциты 5 (2 раза в качестве базисного и 3 раза в качестве переменного), а наименьшую - нейтрофилы (1).

У морских свинок, инфицированных *M.bovis*, через 60 суток после вакцинации ТБЦ-2 уровень сопряженности компонентов иммунной системы также находится почти на прежнем уровне и составляет 11 значимых сочетаний. Изуче-

ние числа связей каждого определяемого показателя с другими позволило установить, что наибольшим участием обладают Т-киллеры, НСТ_{спонт.} и РБТЛ_{пдд} (по 4 раза), наименьшим – нейтрофилы (1), Т-антиген-реактивные лимфоциты (1) и НСТ_{БДЖ} (1).

В дальнейшем, используя значения базисного и переменного параметров дифференциально-прогностических таблиц, оценивали каждого животного исследуемых групп по соответствию интервалов показателей числа иммунокомпетентных клеток хотя бы одному из сочетаний таблицы для выявления морских свинок с высокой активностью иммунокомпетентных клеток.

В результате было определено по 65 % морских свинок с высокой активностью иммунокомпетентных клеток у иммунизированных вакциной БДЖ и белково-целлюлозным комплексом ТБЦ-2. Среди интактных животных таких выявлено всего лишь 5 %. С помощью дифференциально-прогностических таблиц у инфицированных *M. bovis* через 60 суток после введения БДЖ и ТБЦ-2 установлено соответственно 40 (8 из 20-ти) и 45 (9 из 20-ти) % морских свинок с высокой активностью иммунокомпетентных клеток.

Меньшее число животных с высокой активностью после заражения привитых БДЖ объясняется широкими колебаниями степени пораженности (от 0 до 4 баллов). Так, при патологоанатомическом исследовании 6 из 8-и морских свинок с высокой активностью клеток из числа инфицированных через 60 суток после введения БДЖ противостояли экспериментальному заражению. В тоже время среди инфицированных после введения ТБЦ-2 степень пораженности внутренних органов у всех 20-ти животных находилась на близком по значениям уровне (3-5 балла по схеме Г.И. Гельберга и Е.А. Финкель).

На основании анализа дифференциально-прогностических таблиц можно заключить, что у морских свинок перед вакцинацией количество статистически достоверных взаимосвязей между параметрами находится на низком уровне (спокойное функционирование иммунной системы). В период активной работы (иммунизация БДЖ, ТБЦ-2 и последующее инфицирование *M. bovis*) их количество значительно повышается.

Следовательно, иммунизация вакциной БДЖ и белково-целлюлозным комплексом ТБЦ-2 повышает уровень связанности структурных компонентов иммунной системы, увеличивает количество морских свинок с высокой активностью иммунокомпетентных клеток до 65 % через 60 суток после вакцинации. Последующее инфицирование вирулентной культурой *M. bovis* сохраняет функциональное напряжение иммунной системы, однако уменьшает число животных с высокой активностью иммунокомпетентных клеток (соответственно: до 40 % у вакцинированных БДЖ и до 45 % у вакцинированных ТБЦ-2).

3.3.3 Разработка схемы профилактики туберкулеза с применением БДЖ и белково-целлюлозного комплекса ТБЦ-2

Разработанная схема специфической профилактики туберкулеза крупного рогатого скота испытана на базе ОАО ОПХ СибМИС с применением живой противотуберкулезной вакцины БДЖ и белково-целлюлозного комплекса ТБЦ-2, технология изготовления второй разработана во ВНИИБТЖ. Вакцина ТБЦ-2 изготавливается из культуры вакцинного штамма БДЖ, разрушенной ультра-

звук. Препарат выпускают во флаконах, он представляет собой жидкость, состоящую из взвеси в физиологическом растворе целлюлозной матрицы с прикрепленными химическим путем на ее поверхности белковыми антигенами БЦЖ.

Опыты, проведенные на морских свинках, показали, что белково-целлюлозные комплексы обладают протективными свойствами, но более низкими, чем у вакцины БЦЖ, что послужило основанием использовать белково-целлюлозный комплекс для ревакцинации взрослого поголовья.

Для проведения опыта на крупном рогатом скоте отобрали 20 телок и в возрасте 10-20 дней привили вакциной БЦЖ в кожу шеи по 1 мг (1-я группа). Для контроля также отобрали 20 телок в возрасте до 20-ти дней, которым вакцину БЦЖ не вводили (2-я группа). Затем через 45 суток после иммунизации телят обеих групп исследовали на туберкулез с помощью однократной ГПД-туберкулиновой пробы, больных среди привитых животных считали по утолщению кожной складки на 15 мм и выше (М.А. Бажин, В.Л. Солодовников, 1993) и среди не привитых телят по утолщению кожной складки на 3 мм и выше (Наставление по применению (ГПД) туберкулинов для млекопитающих и птиц. Утверждено Департаментом ветеринарии МСХ и П РФ от 16.02.1999 года).

В систему специфической профилактики туберкулеза включен способ прижизненной поствакцинальной оценки иммунитета у привитых животных: с этой целью определяют в периферической крови число иммунокомпетентных клеток и их взаимосвязи дискретно-динамическим анализом. С помощью специальной программы для ПК составляют дифференциально-прогностические таблицы, позволяющие оценить иммунный статус животных, привитых противотуберкулезными препаратами, и оценивают степень защищенности от заболевания животного и стада в целом: до 40 % животных в стаде с высокой активностью иммунокомпетентных клеток отмечают низкий уровень защищенности; от 40 до 70 % - средний уровень; от 70 % и выше - высокий уровень защищенности. Описанный способ позволяет оценить поствакцинальный иммунитет у животных в стаде и установить сроки последующей ревакцинации.

В результате исследований установили высокую активность иммунокомпетентных клеток у 70 % животных, вакцинированных в возрасте до 20-ти дней, через 4-5 мес. после иммунизации вакциной БЦЖ, у 50 % животных через 9-11 мес. и у 30 % животных через 15-17 мес.

Результаты этих исследований убедили в необходимости проведения реиммунизации телок в возрасте 12-14 мес. вакциной БЦЖ внутрикожно в дозе 1 мг на одно животное.

Иммунный статус у животных после ревакцинации БЦЖ определяли также с помощью дискретно-динамического анализа. Выявили у 70 % животных повышенную активность иммунокомпетентных клеток через 6 мес. и у 15 % животных через 14 мес. после ревакцинации. Также было установлено уменьшенное число взаимосвязей в системе иммунитета, что явилось основанием провести реиммунизацию коров белково-целлюлозным комплексом ТВЦ-2.

Последующую реиммунизацию коров опытной группы провели через 14 мес. бесклеточной вакциной ТБЦ-2. Перед реиммунизацией животных исследовали туберкулиновой аллергической пробой и установили, что у всех коров кожная реакция на ППД-туберкулин отсутствовала. Коровам опытной группы вакцину ТБЦ-2 ввели подкожно в дозе 6 мг белка на одно животное.

Через 6 мес. после введения вакцины ТБЦ-2 животных исследовали туберкулиновой аллергической пробой и оценку иммунного статуса коров провели дискретно-динамическим анализом. Туберкулиновой аллергической реакции у коров не обнаружено. Среди реиммунизированных вакциной ТБЦ-2, у 12 из 20 коров (60 %) установили повышенную активность иммунокомпетентных клеток. Аналогичные исследования коров проведены через 9 мес. после реиммунизации вакциной ТБЦ-2. Животных, реагирующих на ППД-туберкулин, не выявлено.

Следовательно, реиммунизация вакциной ТБЦ-2 повышает число устойчивых животных от заболевания туберкулезом и позволяет контролировать стадо крупного рогатого скота на туберкулез аллергической реакцией 2 раза в год (через 6 месяцев после ревакцинации). В последующем по результатам дискретно-динамического анализа ревакцинацию провели еще дважды с интервалом 12 месяцев, что позволило в условиях неблагоприятной по туберкулезу крупного рогатого скота ферме сохранить благополучие стада более 9 лет (срок наблюдения).

Таким образом, в эксперименте разработана схема вакцинации крупного рогатого скота, позволяющая создавать у животных перманентный протективный иммунитет, этим самым повысить профилактический эффект.

Такая схема профилактики была апробирована с положительным результатом в условиях 3-х неблагоприятных по туберкулезу хозяйств Омской области.

3.4 Технология изготовления специфического иммуномодулирующего средства КИМ-М

3.4.1 Разработка способа оценки иммуномодулирующих препаратов

Составление иммунограммы для определения иммунного статуса и оценки эффективности иммуномодулирующих средств является трудоёмким и дорогостоящим исследованием. Также при оценке иммунного статуса нельзя не учитывать, что одно и то же состояние организма или любой его системы может быть достигнуто множеством вариантов сочетаний параметров отдельных компонентов. Какой вариант будет реализован в каждом конкретном случае, зависит не только от генетических особенностей индивида, но и от набора внешних факторов – закономерных и случайных, благоприятных и неблагоприятных. Это положение также затрудняет более объективную оценку иммуномодулирующей эффективности изучаемых препаратов. Все это послужило основанием к разработке способа оценки иммуномодулирующих препаратов на их способность восстанавливать у животных утраченную иммунологическую реактивность.

3.4.1.1 Индукция иммунологической толерантности у морских свинок.

На первом этапе был проведен опыт по определению продолжительности состояния иммунологической толерантности у животных, вызванной ППД-туберкулином для млекопитающих.

С целью индукции у морских свинок иммунологической толерантности 20-ти животным вводили аллерген – ППД-туберкулин для млекопитающих подкожно в дозе 1,5 мл. Затем 20 морских свинок разделили на 5 групп по 4 в каждой. Животных 1-й группы иммунизировали вакциной БЦЖ внутрикожно в дозе 0,1 мг в 0,1 мл физиологического раствора на 3 сутки после толерогенной обработки; 2-й – через 7 суток; 3-й – через 14 суток; 4-й – через 21 сутки; 5-й – через 28 суток. Дополнительно 5 морских свинок (6-я группа) вакцинировали БЦЖ без предварительной толерогенной обработки. Всех морских свинок исследовали ППД-туберкулином через 30 суток после вакцинации.

Результаты кожной аллергической реакции на ППД-туберкулин для млекопитающих показаны в таблице 2.

Таблица 2. – Кожная аллергическая реакция у морских свинок на вакцину БЦЖ после толерогенной обработки

| Группы животных | Количество животных | Сроки введения БЦЖ животным после толерогенной обработки, сутки | Кожная реакция на ППД-туберкулин через 30 суток после вакцинации, мм | |
|-----------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| | | | Реагирующих животных | M±m |
| 1 | 4 | через 3 | - | - |
| 2 | 4 | 7 | - | - |
| 3 | 4 | 14 | - | - |
| 4 | 4 | 21 | 2 | 6,25±3,66 |
| 5 | 4 | 28 | 3 | 10,0±3,56 |
| 6 | 5 | за 30 суток до исследования ППД-туберкулином | 5 | 16,4±3,47 |

Из таблицы 2 видно, что у морских свинок восстановление утраченной иммунологической реактивности начинается с 21 суток после толерогенной обработки. В течение первых двух недель после индукции иммунологической толерантности морские свинки не отвечали на вакцину БЦЖ кожной аллергической реакцией на ППД-туберкулин для млекопитающих. Следовательно, в эти сроки можно испытывать препараты на способность устранения у животных толерантного состояния. Таким образом, оптимальным сроком иммунизации БЦЖ являются 7-14-е сутки после индукции толерантности ППД-туберкулином.

3.4.1.2 Испытание иммуномодулирующих средств и их оценка

Следующим этапом исследований стало испытание широко известных в ветеринарной практике иммуномодуляторов (ронколейкина, тималина, полиоксидония и др.) с помощью определения числа иммунокомпетентных клеток, а также оценки способности их восстанавливать утраченную реактивность.

С этой целью 25-ти морским свинкам ввели толероген (ППД-туберкулин как описано выше) и разделили на 5 групп: 1-я группа – 5-ти морским свинкам

через 3 дня после толерогенной обработки подкожно инъецировали ронколейкин трижды с интервалом 24 часа в дозе по 3,5 тыс. ЕД 0,2 мл физиологического раствора (общая доза на животное – 10,5 тыс. ЕД); 2-я – 5 животным ввели внутримышечно полиоксидоний трижды по 0,06 мг 0,2 мл физиологического раствора (общая доза на животное 0,18 мг); 3-я – 5-ти животным сделали инъекцию поливинилпирролидона (ПВП) по 5 мг на животное в 1 мл физиологического раствора; 4-я – 5 животным внутримышечно инъецировали тималин трижды по 0,2 мг в 0,1 мл физиологического раствора (общая доза на животное 0,6 мг); 5-я – 5 животным подкожно ввели левамизол трижды по 0,5 мг в 0,5 мл физиологического раствора (общая доза на животное 1,5 мг) (кратность и дозы препаратов соответствуют инструкции по их применению). Через 10 суток после инъекции иммуномодуляторов морских свинок иммунизировали вакциной БЦЖ внутривенно в дозе 0,1 мг 0,1 мл физиологического раствора; 6-я группа – 5 здоровых интактных морских свинок также были привиты вакциной БЦЖ; 7-я – 4 интактные морские свинки, которых инфицировали вирулентной культурой *M. bovis* подкожно в дозе 0,0001 мг в 1 мл физиологического раствора. Одновременно инфицировали морских свинок всех опытных групп.

Иммуномодулирующие свойства препаратов изучали с помощью оценки иммунного статуса по определению в крови морских свинок наиболее активных иммунокомпетентных клеток (Т-, В- лимфоцитов, лимфоцитов-киллеров, Т-антиген-реактивных лимфоцитов и нейтрофилов). Отбор проб крови проводили через 30 суток после иммунизации и 30 суток после экспериментального заражения. Концентрацию иммунокомпетентных клеток в крови определяли в абсолютном содержании (тыс./мкл).

Иммунологическая перестройка в организме морских свинок через 30 суток после вакцинации сопровождалась увеличением числа иммунокомпетентных клеток, особенно это касалось Т-лимфоцитов у животных всех групп, кроме 5-й и 6-й группы.

Через 30 суток после инфицирования также отмечали рост у морских свинок количества Т-лимфоцитов, однако достоверных различий оно достигало у животных, которым вводили ронколейкин и вакцину БЦЖ.

Оценку иммуномодулирующих препаратов можно проводить, определяя наиболее активные в иммунном ответе иммунокомпетентные клетки, это затрудняет тестировать эффективность каждого иммуномодулирующего средства в сравнительном аспекте.

Для оценки иммуномодулирующих препаратов использовали этих же морских свинок, которых через 30 суток после инфицирования усыпили эфирным наркозом, провели патологоанатомические исследования и оценили степень пораженности внутренних органов животных и индекс защиты по схеме Г.И. Гельберга и Е.А. Финкеля (1959): сначала определили в количественных показателях интенсивность распространения поражения туберкулезного характера каждой опытной и контрольной морской свинки. Показатель поражений оценивали от 0 до 9. Так, показатель поражений в 1-й группе составил: 3,0,0,3,0; во 2-й – 3,3,3,4; в 3-й группе – 4,4,4,3,0; в 4-й группе – 4,4,3,0; в 5-й группе – 4,3,0,3,4; в 6-й группе – 0,0,5,3,3 и в 7-й группе – 4,4,8,7.

Затем установили средний показатель поражения для каждой опытной группы животных путем вычисления средних арифметических величин из индивидуальных показателей. Так, показатель интенсивности поражений 1-й группы составил 1,2; 2-й – 3,25; 3-й – 3,0; 4-й – 2,75; 5-й – 2,80; 6-й – 2,2 и 7-й – 5,75.

Для оценки напряженности иммунитета применили индекс защиты, предложенный А.И. Тогуновой (1951). Из среднего показателя интенсивности поражения контрольной группы вычитали такой же показатель, установленный для опытной группы. Затем полученный остаток, взятый в процентах, разделили на средний показатель интенсивности поражения контрольной группы. Например, индекс защиты в 1-й группе составил 79%; во 2-й группе – 43%.

По результатам оценки установлено, что ронколейкин является наиболее эффективным препаратом для восстановления иммунологической реактивности (индекс защиты 79%), несколько уступали ему тималин (52%), левамизол (51%), ПВП и полиоксидоний (соответственно: 48 и 43%).

3.4.2 Изготовление специфического иммуномодулятора

Вакцина БЦЖ, применяемая в настоящее время с целью профилактики туберкулеза, стимулирует одновременно естественную резистентность организма, а также используется для специфической патогенетической терапии больных туберкулезом легких. Стимулирующие свойства вакцины БЦЖ послужили основанием для приготовления из отдельных фракций разрушенных микобактерий БЦЖ иммуномодулирующих средств.

3.4.2.1 Получение антигенного комплекса из вакцинного штамма БЦЖ

С целью получения антигенного комплекса нами была проведена следующая работа. Произвели посев вакцинного штамма БЦЖ на жидкую синтетическую среду Сотона. Вакцинный штамм культивировали в конических колбах емкостью 0,5-1,0 л при температуре 37° С в течение 2-3-х недель. Выросшую бактериальную массу собирали и трижды отмывали стерильным физиологическим раствором, центрифугировали в течение 20 минут при 3 тыс. об/мин. Отмытую бактериальную массу ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе из расчета 1:5 (1,0 г бактериальной массы и 5 мл физиологического раствора). Флаконы с суспензией бактериальных клеток помещали на 24 часа на шуттель-аппарат при комнатной температуре.

Суспензию бактериальных клеток подвергали ультразвуковой дезинтеграции на аппарате УЗДН-1 (22-35 кГц, 60-70 Вт/см² в течение 30 мин), полученную взвесь центрифугировали 30 мин при 15000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали. Количество белка в надосадочной жидкости определяли на фотоэлектроколориметре с использованием красителя бромфенолового синего (БФС).

В объем антигенного комплекса (99,3 мл) добавляли 37%-ного медицинского формальдегида 0,7 мл или 40%-ного – 0,6 мл. Реакционную смесь инкубировали в термостате при 37°С в течение 5-9 дней, конъюгировали с поливинилпирролидоном молекулярной массой 12600±2700, концентрацию которого до-

вели на 1 мг/мл белка 600 мг ПВП (1:600). В 100 мг/мл белка после инкубирования постепенно частями добавляли ПВП, размешивая на магнитной мешалке при комнатной температуре, вновь измеряли содержание белка, довели дозу по содержанию белка на кг массы животного. Реакционную смесь разливали во флаконы и стерилизовали на установке АСИС при 80°C в течение 30 мин и в стерильном боксе закрывали пробками. В результате получили комплексный иммуномодулятор микробного происхождения (КИМ-М).

3.4.2.2 Испытание иммуномодулирующих и протективных свойств препаратов на морских свинках

Для оценки способности антигенных комплексов восстанавливать у морских свинок утраченную иммунологическую реактивность был проведен опыт по следующей схеме. С целью индукции толерантности 16 морским свинкам ввели ППД-туберкулин для млекопитающих, инкубированный с раствором формалина, подкожно в дозе 1,3 мл и разделили животных по 4 в каждой группе: через 5 суток после индукции толерантности 4-м морским свинкам инъецировали комплекс антигенов БЦЖ (КАГ-БЦЖ) подкожно в дозе 500 мкг белка (1-я группа); 4-м – комплекс антигенов БЦЖ, инкубированный с раствором формалина (КАГ-БЦЖ-Ф) подкожно в дозе 500 мкг белка (2-я группа); 4-м животным ввели комплекс антигенов БЦЖ, инкубированный с формалином и конъюгированный с поливинилпирролидоном (КАГ-БЦЖ-Ф-ПВП), подкожно в дозе 500 мкг белка (3-я группа); 4-м – инъецировали иммуномодулирующее средство (В.Н. Ласкавый, В.В. Рыбин патент РФ RU №2034542, кл. А 61К 31/305, 1995) подкожно в дозе 1,3 мл (4-я группа). 4 здоровые морские свинки служили в качестве контроля (5-я группа).

Морских свинок первых 4-х групп через 7 суток после введения изучаемых препаратов привили вакциной БЦЖ внутривенно в дозе 100 мкг в 0,1 мл и через 30 суток после иммунизации животных всех групп заразили вирулентной культурой *M. bovis* штамм 14 подкожно в дозе 0,0001 мг/мл и через 30 суток подвергли эвтаназии и проводили патологоанатомические исследования.

Провели оценку иммуномодулирующих свойств препаратов на их способность восстанавливать иммунологическую реактивность у морских свинок. Наиболее высокая способность восстанавливать утраченную иммунологическую реактивность у морских свинок установлена у препарата, изготовленного из комплекса антигенов БЦЖ, инкубированного с формалином и конъюгированного с ПВП (3-я группа): степень пораженности органов – $1,75 \pm 0,75$ баллов; индекс защиты – 80%, тогда как у комплекса антигенов БЦЖ (1-я группа), соответственно: $4,0 \pm 0,00$; 53,8%. Несколько выше эта способность у известного иммуномодулирующего средства (В.Н. Ласкавый, В.В. Рыбин), соответственно: $3,66 \pm 0,66$; 57,7% (4-я группа). Способность восстанавливать утраченную иммунологическую реактивность у препарата, изготовленного из комплекса антигенов БЦЖ, инкубированного с формалином несколько выше, соответственно: $2,66 \pm 0,66$; 69,3% (2-я группа).

По результатам опыта из трех синтезированных иммуномодуляторов с целью изучения иммуногенных свойств был взят как наиболее эффективный пре-

парат, изготовленный из комплекса антигенов БЦЖ, инкубированного с формалином и конъюгированного с ПВП (АГ-БЦЖ-Ф-ПВП), и в сравнении с имеющимся и вакциной БЦЖ были определены иммуногенные и протективные свойства.

С этой целью 29 морских свинок разделили на 6 групп: 5-ти морским свинкам изучаемый препарат (АГ-БЦЖ-Ф-ПВП) ввели в дозе 500 мкг белка в 1,0 мл (1-я группа); 5-ти этот же препарат в дозе 1000 мкг белка в 1,0 мл (2-я группа); 5-ти этот же препарат ввели в дозе 1500 мкг белка в 1,5 мл (3-я группа); 5-ти морским свинкам инъецировали белково-целлюлозный комплекс ТБЦ-2 в дозе 500 мкг в 0,5 мл белка (4-я группа); 5-ти – ввели вакцину БЦЖ внутривенно в дозе 100 мкг в 0,1 мл физиологического раствора (5-я группа); 4 морские свинки использовали в качестве контроля (6-я группа). Через 30 суток морских свинок всех групп инфицировали *M. bovis* шт. 14 подкожно в дозе 0,0001 мкг и еще через 30 суток подвергли эвнотазии для проведения патологоанатомических исследований.

Результаты исследований показали, что вакцина БЦЖ наиболее активно защищает морских свинок от экспериментального заражения: степень пораженности – $1,8 \pm 0,75$ и индекс защиты 79%; затем АГ-БЦЖ-Ф-ПВП в дозе 500 мкг, соответственно $3,33 \pm 0,33$, 61%; ниже протективные свойства у ТБЦ-2 в дозе 500 мкг, соответственно $4,2 \pm 0,20$, 50%.

3.4.2.3 Испытание препарата на молодняке крупного рогатого скота

Для дальнейшего испытания на телятах был отобран конъюгат, изготовленный из комплекса антигенов БЦЖ, инкубированный с формалином и конъюгированный с ПВП (АГ-БЦЖ-Ф-ПВП).

С целью выяснения способности этого конъюгата усиливать протективные свойства вакцины БЦЖ провели опыт по следующей схеме. В опыт взяли 60 телят в возрасте от 10 до 20 дней и разделили их на 3 группы: 20-ти телятам ввели изучаемый препарат подкожно в дозе 20 мкг белка на кг массы животного (0,8-1,0 мг белка на животное) в 1,0 мл (1-я группа). Через 30 суток этих животных привили вакциной БЦЖ в дозе 1 мг в 0,2 мл. Других 20 телят аналогичного возраста иммунизировали также вакциной БЦЖ (2-я группа) и 20 телят использовали в качестве контроля (3-я группа). Через 4 мес. у животных всех групп отобрали венозную кровь, в которой определили концентрацию нейтрофилов, Т-лимфоцитов, Т-киллеров, Т-антиген-реактивных лимфоцитов и В-лимфоцитов.

Содержание всех иммунокомпетентных клеток у телят, привитых вакциной БЦЖ после введения препарата, достоверно выше, чем у контрольных животных, особенно выше количество Т-лимфоцитов, Т-киллеров, Т-антиген-реактивных лимфоцитов и нейтрофилов ($P < 0,001$). Повышенное число иммунокомпетентных клеток установлено также у телят, привитых только вакциной БЦЖ.

Результаты оценки иммунного статуса опытных групп с использованием дискретно-динамического анализа показали, что введение препарата молодняку крупного рогатого скота перед вакцинацией БЦЖ в значительной степени уси-

ливают сопряженность (связанность) компонентов иммунной системы. Так, у интактного молодняка определено 3 пары значимых сочетаний, у вакцинированных БЦЖ – 8 и вакцинированных БЦЖ, после введения препарата – 10 пар сочетаний.

На основании выявленных достоверных сочетаний параметров составили дифференциально-прогностическую таблицу (табл. 3).

В таблице 3 у интактного молодняка крупного рогатого скота представлено 3 значимых сочетания параметров. Так, нейтрофилы в качестве переменного параметра взаимосвязаны с Т-киллерами, Т-антиген-реактивными лимфоцитами и В-лимфоцитами.

Таблица 3. – Дифференциально-прогностическая таблица для оценки иммунитета у молодняка крупного рогатого скота, тыс/мкл

| № п/п | Сочетание: базис (вариабельный параметр) | n | t- критерий по Стью- денту | базис | вари- бель- ный |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----|----------------------------------------|-------|-----------------------|
| <i>Интakтные</i> | | | | | |
| 1 | Т-киллеры (нейтрофилы) | 20 | 2,57 | ≤0,42 | ≤0,84 |
| 2 | Т-антиген-реактивные лимф. (нейтрофилы) | | 2,50 | ≤0,05 | ≤0,72 |
| 3 | В-лимфоциты (нейтрофилы) | | 2,41 | ≤0,70 | ≤0,46 |
| Количество иммунных животных в процентах | | 6 | 30 % | | |
| <i>Привитые вакциной БЦЖ</i> | | | | | |
| 1 | В-лимфоциты (Т-киллеры) | 20 | 4,48 | ≥4,30 | ≥8,60 |
| 2 | Нейтрофилы (Т-антиген-реактивные лимфоциты) | | 4,27 | ≤1,90 | ≤0,45 |
| 3 | В-лимфоциты (Т-лимфоциты) | | 3,69 | ≥4,30 | ≥4,63 |
| 4 | Т-киллеры (В-лимфоциты) | | 3,55 | ≥6,71 | ≥4,89 |
| 5 | Т-антиген-реактивные лимфоциты (Т-лимф.) | | 3,44 | ≥1,11 | ≥2,85 |
| 6 | Т-лимфоциты (В-лимфоциты) | | 3,33 | ≥3,16 | ≥3,44 |
| 7 | Т-киллеры (Т-лимфоциты) | | 3,09 | ≥6,71 | ≥2,84 |
| 8 | Т-антиген-реактивные лимфоциты (нейтрофилы) | | 2,90 | ≥1,11 | ≥4,68 |
| Количество иммунных животных в процентах | | 14 | 70 % | | |
| <i>Привитые вакциной БЦЖ после введения конъюгата</i> | | | | | |
| 1 | Т-антиген-реактивные лимфоциты (нейтрофилы) | 20 | 6,53 | ≤0,89 | ≥2,73 |
| 2 | Нейтрофилы (Т-антиген-реактивные лимфоциты) | | 4,77 | ≥5,96 | ≤1,46 |
| 3 | Т-киллеры (В-лимфоциты) | | 3,25 | ≤4,31 | ≤2,01 |
| 4 | Т-киллеры (Т-антиген-реактивные лимфоциты) | | 3,25 | ≤4,31 | ≤1,04 |
| 5 | Т-антиген-реактивные лимфоциты (Т-киллеры) | | 2,94 | ≤0,89 | ≤5,35 |
| 6 | Т-антиген-реактивные лимфоциты (Т-лимф.) | | 2,91 | ≤0,89 | ≤2,94 |
| 7 | Нейтрофилы (Т-лимфоциты) | | 2,80 | ≥5,96 | ≤3,70 |
| 8 | Т-лимфоциты (нейтрофилы) | | 2,74 | ≤3,12 | ≥3,52 |
| 9 | В-лимфоциты (Т-киллеры) | | 2,57 | ≤1,54 | ≤6,07 |
| 10 | Нейтрофилы (Т-киллеры) | | 2,36 | ≥5,96 | ≥6,32 |
| Количество иммунных животных в процентах | | 16 | 80 % | | |

Число значимых сочетаний у животных, привитых только вакциной БЦЖ, по сравнению со здоровыми увеличивается до 8, что свидетельствует о функциональном напряжении иммунной системы. Наибольшим числом связей определяемых показателей с другими обладают Т-лимфоциты (1 раз в качестве базисного и 3 раза в качестве переменного параметров) и В-лимфоциты (по 2 раза в качестве базисного и переменного параметров), наименьшим (2) – нейтрофилы.

У молодняка, привитого вакциной БЦЖ, после введения изучаемого препарата уровень связанности структурных компонентов иммунной системы увеличивается до 10 сочетаний. При этом наибольшим числом характеризуются нейтрофилы, Т-киллеры и Т-антиген-реактивные лимфоциты (по 5 сочетаний), наименьшим – В-лимфоциты (2).

Далее, используя дифференциально-прогностическую таблицу, оценивали каждое животное исследуемых групп по всем значимым сочетаниям параметров. Согласно результатам анализа высокой активностью иммунокомпетентных клеток характеризовались 30 % интактных животных, 70% – привитых БЦЖ и 80% – привитых БЦЖ после введения конъюгата.

Следовательно, с увеличением числа значимых сочетаний параметров повышается степень защищенности животных против туберкулеза. У телят, привитых только БЦЖ и после введения БЦЖ и конъюгата, иммунная система находится в состоянии функционального напряжения (активной работы), в то время как у интактного молодняка крупного рогатого скота количество статистически достоверных взаимосвязей между параметрами составляет только 3 сочетания (спокойное функционирование иммунной системы).

3.5 Оценка иммунного статуса у крупного рогатого скота при лейкозе

3.5.1 Иммунный статус у здорового и родившегося от матерей-вирусоносителей молодняка крупного рогатого скота

Для сравнительного изучения взаимосвязей между иммунологическими показателями у потомства, полученного от здоровых и коров-матерей, носителей ВЛКРС был проведен следующий опыт. В крови молодняка крупного рогатого скота, родившегося от матерей-вирусоносителей, в разные возрастные периоды определили число иммунокомпетентных клеток в абсолютном содержании (тыс/мкл), в сыворотке крови определили концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в у.е., а также оценили функциональное состояние нейтрофилов в тесте с нитросиним тетразолием (НСТ) в спонтанном без нагрузки и стимулированном с последующим подсчетом коэффициента стимуляции К ст. ($K \text{ ст } \text{НСТ} = \frac{\text{оптическая плотность в стимулированных лунках}}{\text{оптическая плотность в лунках без стимуляции}}$). Описание иммунного статуса молодняка крупного рогатого скота 1-2, 5-6 и 12-14-ти месячного возраста, родившихся от матерей-вирусоносителей, проводили в сравнении со здоровыми этих же возрастных групп (по 20 голов в каждой возрастной группе).

Анализ средних показателей иммунологических параметров показал, что количественный состав иммунокомпетентных клеток в крови здоровых и родившихся от матерей-вирусоносителей телят имеет существенные различия. Так,

количество нейтрофилов, Т-, В-лимфоцитов и Т-антиген-реактивных лимфоцитов у телят в возрасте 1-2 мес., родившихся от матерей-вирусоносителей, по отношению к количеству у здоровых телят этого же возраста достоверно ($P < 0,05$) снижается, в то время как К ст. НСТ повышается.

У молодняка в возрасте 5-6 мес. достоверному увеличению подвержено содержание Т-лимфоцитов, Т-киллеров и Т-антиген-реактивных лимфоцитов. Также отмечается повышение К ст. НСТ и концентрации ЦИК. Количество нейтрофилов и В-лимфоцитов также увеличивается, однако не достигает существенного различия.

Зарегистрировано резкое увеличение ($P < 0,001$) числа Т-киллеров и К ст. НСТ у молодняка в возрасте 12-14 мес.

Дискретно-динамический анализ, проведенный в дальнейшем, позволил установить, что изменения уровней переменных параметров в подгруппах с максимальными и минимальными значениями базисного параметра ЦИК у телят 1-2-месячного возраста, родившихся от матерей-вирусоносителей, по сравнению со здоровыми сопровождаются сменой направления связей с отрицательных на положительные и наоборот.

Исследование телят в возрасте 5-6 мес., полученных от инфицированных матерей, выявило более резкие отклонения во взаимосвязях между иммунологическими параметрами, которые можно рассматривать как показатели наличия иммунного дисбаланса, способствующего прогрессированию патологических процессов. Так, наиболее выраженные отклонения, характеризующиеся изменением направления и интенсивности связей, наблюдались при базисе ЦИК, В-лимфоциты, К ст. НСТ, нейтрофилы и Т-антиген-реактивные лимфоциты.

У молодняка крупного рогатого скота в возрасте 12-14 мес., родившегося от матерей-вирусоносителей, изменения интенсивности и направления связей доминировали при базисе нейтрофилов, Т-киллеры, К ст. НСТ, ЦИК, В-лимфоциты и Т-антиген-реактивные лимфоциты.

Также установлено, что у телят, полученных от матерей носителей вируса лейкоза, количество статистически достоверных взаимосвязей между параметрами в возрасте 1-2 и 5-6 мес. принципиально не отличается от таковых у здоровых животных. В возрасте 12-14 мес. у молодняка, родившихся матерей-вирусоносителей, количество взаимосвязей увеличивается.

На основании выявленных со степенью достоверности ($P \leq 0,05$) значимых сочетаний параметров составили дифференциально-прогностические таблицы и оценивали каждого животного исследуемых групп по всем значимым сочетаниям параметров.

В результате анализа дифференциально-прогностических таблиц было установлено 25 % среди здорового молодняка крупного рогатого скота в возрасте 1-2 мес. и 20 % в возрасте 5-6 мес. с высокой активностью иммунокомпетентных клеток. У телят, родившихся от матерей-вирусоносителей, в возрасте 1-2 и 5-6 мес. выявлено по 15 % и в возрасте 12-14 мес. 5 % с высокой активностью иммунокомпетентных клеток.

Таким образом, можно заключить, что у телят, родившихся от инфицированных матерей, к 12-14 месячному возрасту формируется функциональное

напряжение иммунной системы, которое характеризуется увеличением числа взаимосвязей по сравнению со здоровым молодняком крупного рогатого скота, а также незначительным (5%) количеством животных с высокой активностью иммунокомпетентных клеток.

3.5.2 Иммунный статус у здорового, инфицированного ВЛКРС и больного лейкозом крупного рогатого скота

Для оценки иммунного статуса отобрали 60 голов крупного рогатого скота, которых разделили на 3 группы. 1-ю группу составили 20 голов интактного (здорового) крупного рогатого скота. 2-ю группу – 20 носителей вируса лейкоза КРС (РИД-положительных на лейкоз) и 3-ю – 20 больных, выявленных гематологическим способом. В периферической крови определили содержание иммунокомпетентных клеток в абсолютном содержании (тыс/мкл), количество циркулирующих иммунных комплексов в условных единицах (у.е.) и функциональную активность нейтрофилов в тесте с нитросиним тетразолием в спонтанном и стимулированном вариантах с последующим подсчетом коэффициента стимуляции (К ст. НСТ).

У животных-вирусоносителей наблюдается достоверное повышение концентрации Т-киллеров, В-лимфоцитов, Т-антиген-реактивных лимфоцитов и ЦИК, в то время как число Т-лимфоцитов снижается. В группе больных животных отмечается увеличение количества Т-лимфоцитов, Т-киллеров, В-лимфоцитов, Т-антиген-реактивных лимфоцитов и ЦИК.

Применение дискретно-динамического анализа в оценке иммунного статуса носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных выявило отклонения, характеризующиеся резким изменением направления и интенсивности связей. Кроме того, установлено, что в состоянии нормы у здорового крупного рогатого скота уровень связанности компонентов иммунной системы достаточно низок, с развитием патологического процесса у носителей ВЛКРС и больных лейкозом происходит адаптационная перестройка иммунной системы, обуславливающая изменение характера взаимосвязей.

На основании выявленных достоверных взаимосвязей составили дифференциально-прогностическую таблицу, которая позволяет выявить животных с функциональным напряжением иммунной системы или с наличием иммунной недостаточности, вызванной вирусом лейкоза крупного скота.

Отмечено 1 значимое сочетание параметров у здоровых коров. Так, Т-антиген-реактивные лимфоциты в качестве базисного параметра взаимосвязаны с нейтрофилами.

Количество значимых сочетаний у животных-вирусоносителей по сравнению со здоровыми увеличивается до 10 (в 10 раз). Изучение числа связей каждого определяемого показателя с другими позволило установить, что наибольшей долей участия обладают Т-киллеры и Т-антиген-реактивные лимфоциты (по 3 раза в качестве базисного и вариабельного параметров), наименьшей – Т-лимфоциты (4) и В-лимфоциты (4). Это свидетельствует о функциональном напряжении иммунной системы за счёт потребности подключения большего ко-

личества взаимосвязей её структурных компонентов по сравнению со спокойным функционированием (здоровые животные).

У больных животных число значимых сочетаний по сравнению со здоровыми увеличивается до 12, что также свидетельствует о функциональном напряжении иммунной системы. Устанавливается много отличительных специфических связей. Наибольшей активностью стали обладать К ст. НСТ (6) и В-лимфоциты (6).

Затем вычислили коэффициент сопряженности (КС) у здорового, РИД-положительного и больного лейкозом крупного рогатого скота по формуле:

$$КС = \frac{\text{количество достоверных связей}}{\text{количество возможных связей}}$$

КС у здоровых составил 0,02, у носителей ВЛКРС – 0,24 и у больных лейкозом коров 0,28.

Таким образом, малое число взаимосвязей изученных иммунологических показателей, а, следовательно, низкое значение коэффициента сопряженности (КС = 0,02) – свидетельство спокойного функционирования иммунной системы (более высокого уровня здоровья), большее число и значение КС от 0,24 и выше – признак функционального напряжения иммунной системы.

В дальнейшем, используя значения базисного и варибельного параметров таблицы, оценивали каждого животного исследуемых групп по всем значимым сочетаниям параметров. Если показатели числа иммунокомпетентных клеток животного соответствовали интервалам хотя бы одного из сочетаний (базисного, варибельного) таблицы, таких животных признавали с функциональным напряжением иммунной системы или с наличием иммунной недостаточности, вызванной вирусом лейкоза крупного скота.

Проводя подобный анализ иммунологических параметров дифференциально-прогностической таблицы по оценке иммунного статуса, было определено 90 % среди больных животных и 55 % среди носителей ВЛКРС с функциональным напряжением иммунной системы. Среди здоровых с функциональным напряжением иммунной системы не выявлено.

Используя дискретно-динамический принцип оценки иммунного статуса и известные методы диагностики лейкоза (серологический и гематологический) в нескольких хозяйствах, неблагополучных по лейкозу крупного рогатого скота, было исследовано 118 голов крупного рогатого скота (табл. 4).

Таблица 4. – Результаты оценки иммунного статуса у животных из ферм, неблагополучных по лейкозу крупного рогатого скота

| Серологические исследования | Количество животных | Выявлено дискретно-динамическим анализом | | |
|--------------------------------|---------------------|------------------------------------------|------------------------------|------|
| | | здоровых | с функциональным напряжением | в % |
| РИД (-) | 40 | 31 | 9 | 22,5 |
| РИД (+) | 78 | 9 | 69 | 85,5 |
| в т.ч. гематологически больные | 37 | - | 37 | 100 |
| Всего | 118 | 40 | 78 | 66,1 |

Из таблицы 4 видно, что дискретно-динамический принцип оценки иммунного статуса при лейкозе крупного рогатого скота позволил выявить 78 животных с функциональным напряжением иммунной системы, вызванным вирусом лейкоза (66,1 % от общего числа), что подтвердило диагноз у всех 37-ми коров с гемограммой, характерной для гематологической стадии лейкоза, а также у 69-ти из 78-ми (88,5 %) у носителей ВЛКРС. Кроме того, удалось дополнительно выявить 9 из 40 РИД-отрицательных животных (22,5%) с недостаточностью иммунной системы в условиях неблагополучной фермы. Необходимо отметить, что во всех исследованных группах КС варьировал от 0,31 до 0,38.

Таким образом, дискретно-динамический принцип оценки иммунного статуса дает возможность обнаружить до 100 % животных с гемограммой, характерной для гематологической стадии лейкоза, и на 22,5 % больше среди РИД-отрицательных животных с иммунной недостаточностью в условиях неблагополучной по лейкозу крупного рогатого скота фермы.

3.5.3 Способ выявления крупного рогатого скота с повышенным риском к заболеванию лейкозом

Были проведены исследования по определению коэффициента отношения процентного содержания лимфоцитов к различным субпопуляциям лимфоцитов (Т-, В-лимфоциты, Т-антиген-реактивные лимфоциты и Т-киллеры) для установления наиболее стабильного признака, отражающего иммунный статус животных.

Установлено, что коэффициент отношения (K_0) лимфоцитов к Т-киллерам у носителей вируса лейкоза и больных по отношению к здоровым коровам не достигает существенной разницы ($P > 0,05$). K_0 лимфоцитов к В-лимфоцитам у животных-вирусоносителей уменьшается, тогда как у больных увеличивается. K_0 лимфоцитов к Т-антиген-реактивным лимфоцитам у животных-вирусоносителей с высокой степенью достоверности уменьшается, а у больных не достигает статистически значимых различий. Наиболее стабильным признаком является процентное отношение числа лимфоцитов к числу Т-лимфоцитов.

Анализируя иммунологические параметры каждого отдельного животного установили, что отношение лимфоцитов к Т-лимфоцитам среди здоровых не превышает 3,5, среди вирусоносителей – от 4,3 и выше и среди больных варьирует от 4,88 до 16,4.

Отношение лимфоцитов к В-лимфоцитам среди здоровых и инфицированных не имеет существенных различий и варьирует от 0,77 до 4,55, в то время как у большинства больных это отношение увеличивается. Отношение лимфоцитов к Т-киллерам и лимфоцитов к Т-лимфоцитам, распознающим антигены вируса лейкоза, среди здоровых, носителей вируса лейкоза и больных животных находится в одних пределах и не представляется возможным выделить какой-либо признак различий.

Следовательно, наиболее стабильным признаком в иммунной системе больных и животных-вирусоносителей, свидетельствующим об иммунной недостаточности, является изменение общего числа лимфоцитов и Т-лимфоцитов с рецептором к эритроцитам барана.

В дальнейшем в условиях хозяйства, неблагополучного по лейкозу крупного рогатого скота, исследовали телят, полученных от матерей-вирусоносителей, в возрасте до 2-х мес., 4-6 мес., 12-14 мес. в сравнении с телятами этих же возрастных групп из благополучного по лейкозу крупного рогатого скота хозяйства. Телята всех возрастных групп не реагировали в РИД. В крови определяли коэффициент отношения процентного содержания лимфоцитов к Т-лимфоцитам.

Коэффициент отношения содержания лимфоцитов к числу Т-лимфоцитов у 11-ти из 15-ти животных (73 %) в возрасте до 2-х мес. из неблагополучного хозяйства составил от 4,68 и выше. Эту группу телят относить к числу с повышенным риском к заболеванию лейкозом преждевременно из-за материнских колостральных антител к вирусу лейкоза, присутствие их в крови блокирует рецепторы Т-лимфоцитов к эритроцитам барана и препятствует розеткообразованию. У 15-ти телят этой же возрастной группы из благополучного хозяйства этот коэффициент варьировал в пределах от 1,07 до 2,35 и указывал на отсутствие у животных вируса лейкоза.

В возрасте 4-6 мес. у одного из 15-ти животных, полученных от матерей-вирусоносителей, коэффициент отношения составил 17,0, у остальных до 3,42. В дальнейшем этих телят подвергли гематологическому методу исследования и выявили того же самого животного, что подтвердило диагноз. У 15-ти телят из благополучного хозяйства коэффициент отношения находился в пределах от 1,08 до 3,6 и указывал на отсутствие у животных вируса лейкоза.

У 14 животных в возрасте 12-14 мес. из благополучного хозяйства коэффициент отношения составил от 4,35 и выше (93,3 %). Дальнейшее гематологическое исследование позволило выявить 7 больных, из числа этих 14-ти животных. У 15-ти телят этого же возраста из благополучного хозяйства коэффициент отношения варьировал в пределах от 1,10 до 2,31.

Также были исследованы 20 коров, которые содержались в пункте по поддержке инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота, заражение которого было выявлено серологически (РИД). Коэффициент отношения содержания лимфоцитов к числу Т-лимфоцитов у 18-ти коров составил от 4,31 до 41,5, что свидетельствовало о повышенном риске к заболеванию лейкозом, у 2-х — 2,96 и 2,62 соответственно. В последующем при исследовании гематологическим методом диагноз на лейкоз подтвержден у 11-ти коров. У 20-ти коров из благополучного хозяйства это отношение варьировало в пределах от 2,50 до 3,93.

Таким образом, увеличение коэффициента отношения общего числа лимфоцитов к числу Т-лимфоцитов с рецептором к эритроцитам барана указывает на иммунную недостаточность и является наиболее стабильным признаком в иммунной системе вирусоносителей или больных лейкозом крупного рогатого скота. Если коэффициент отношения $\leq 4,2$, то животное считают здоровым, если коэффициент отношения $\geq 4,3$, то животное признается с повышенным риском к заболеванию лейкозом.

4 ВЫВОДЫ

1. Разработаны и оптимизированы методы контроля и коррекции иммунного статуса у крупного рогатого скота, основанные на применении иммунологических методов исследования, дискретно-динамического анализа, оценке иммуномодулирующих и протективных свойств известных и вновь синтезируемых биологических препаратов. Программное обеспечение анализа иммунологических параметров уменьшает затраты времени в 20 раз и составляет 5-10 минут.

2. Иммунный статус у молодняка крупного рогатого скота, привитого вакциной БЦЖ в возрасте до 20-ти дней, характеризуется увеличением в крови числа иммунокомпетентных клеток в 1,3-3,8 раза. К 9-11-ти месячному возрасту уменьшилось и составило: Т-лимфоцитов ($1,05 \pm 0,08$ тыс/мкл); Т-киллеров ($2,35 \pm 0,18$ тыс/мкл); В-лимфоцитов ($2,37 \pm 0,21$ тыс/мкл); Т-антиген-реактивных лимфоцитов ($0,79 \pm 0,10$ тыс/мкл); нейтрофилов ($1,92 \pm 0,26$ тыс/мкл) и сохранилось на этом уровне до 15-17-ти месячного возраста.

3. Установлены методом дискретно-динамического анализа и разработанной на его основе дифференциально-прогностической таблицы значимые в оценке противотуберкулезного иммунитета ($P \leq 0,05$) сочетания показателей активности иммунокомпетентных клеток крови. Иммунизация вакциной БЦЖ усиливает в системе иммунитета крупного рогатого скота взаимосвязи иммунологических параметров и увеличивает число их сочетаний.

4. Экспериментальными исследованиями с использованием дифференциально-прогностических таблиц и значимых сочетаний параметров (базис, вариабельный) выявлены из числа телят, привитых БЦЖ до 20-ти дней, в возрасте 4-5 месяцев 70 % иммунных животных, в возрасте 9-11 месяцев 50 % и в возрасте 15-17 месяцев 30 % иммунных животных.

5. Разработана система иммунной защиты крупного рогатого скота от туберкулеза, предусматривающая первичную иммунизацию молодняка в возрасте 10-20 суток вакциной БЦЖ, реиммунизацию в возрасте 15-17 мес. также вакциной БЦЖ, а все последующие противотуберкулезной бесклеточной вакциной ТБЦ-2 через каждые 12 мес. до оздоровления фермы (хозяйства). Контроль иммунного и инфекционного статуса привитых животных проводят туберкулиновой аллергической пробой через 6 мес.

6. Разработан метод оценки иммуномодулирующей способности препаратов, включающий индукцию толерантности ППД-туберкулином для млекопитающих, восстановление утраченной реактивности изучаемым средством, иммунизацию БЦЖ на способность противостоять экспериментальному заражению возбудителем туберкулеза и по результатам патологоанатомического исследования оценку иммуномодуляторов по индексу защиты: от 100% до 67% – высокая способность иммуномодуляции, 66-43% средняя, от 42% и меньше – низкая.

7. Предложена новая технология изготовления специфических средств на основе комплекса антигенов микобактерий вакцинного штамма БЦЖ и поливинилпирролидона (ПВП), позволяющая создавать препараты, способные восстанавливать у животных утраченную иммунологическую реактивность, устранять

вторичные иммунодефициты и усиливать протективные свойства вакцины БЦЖ.

8. Иммуномодулятор, составленный нами на основе комплекса антигенов микобактерий БЦЖ, инкубированный с формалином, и конъюгированный с ПВП в соотношении 1 мг/мл белка комплекса антигенов к 600 мг ПВП наиболее перспективный. Специфический иммуномодулятор усиливает протективные свойства вакцины БЦЖ, о чем свидетельствует увеличение количества взаимосвязей в системе иммунитета и числа телят с высокой активностью иммунокомпетентных клеток, выявленных с помощью дискретно-динамического анализа.

9. Разработан иммунологический метод для выявления больного и инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота, основанный на оценке функционального состояния Т-лимфоцитов в реакции спонтанного розеткообразования. Этот метод позволяет выявлять на 46,66 % больше животных, имеющих иммуно-клеточные изменения в организме, свойственные лейкозу крупного рогатого скота, тем самым повышает достоверность диагностики инфекции в совокупности с традиционными методами. Пригоден для оперативной оценки инфекционного статуса и для прогнозирования эпизоотического процесса лейкоза в стаде.

10. Комплексная оценка иммунного статуса крупного рогатого скота при лейкозе включает определение концентрации нейтрофилов, Т-лимфоцитов, Т-антиген-реактивных лимфоцитов, В-лимфоцитов, количество ЦИК, оценку функционального состояния нейтрофилов в НСТ-тесте. С помощью компьютерной программы выделяют те сочетания параметров, которые присущи здоровым, инфицированным и больным лейкозом животным, вычисляют коэффициент сопряженности (КС) по формуле: $КС = \frac{\text{количество достоверных связей}}{\text{количество возможных связей}}$. При

КС равном или превышающем значение 0,24 считают признаком функционального напряжения иммунной системы.

11. Оценка иммунного статуса крупного рогатого скота с помощью дискретно-динамического анализа иммунокомпетентных клеток позволяет в неблагополучных по лейкозу стадах выявить до 100 % животных с гемограммой, характерной для гематологической стадии лейкоза, и до 22,5 % из числа РИД-отрицательных животных с иммунной недостаточностью. Способ может быть использован для более точной иммунно-эпизоотологической и прогностической оценки состояния стада крупного рогатого скота по лейкозу.

12. Число сочетаний иммунологических параметров со степенью достоверности ($P \leq 0,05$) является важнейшим критерием, характеризующим спокойное или напряженное состояние иммунной системы. Иммунный статус крупного рогатого скота больного туберкулезом характеризуется увеличением количества таких сочетаний в 6,5 раз, а носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных в 10 раз и выше по сравнению с интактными животными.

5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Результаты научных исследований использованы для разработки 5 методических рекомендаций, утвержденных на федеральном и региональном уровнях:

1. «Дискретно-динамический анализ в оценке иммунитета» (одобренны решением подсекции «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины СО РАСХН, протокол № 5 от 21 июня 2005 г.).

2. «Методы оценки противотуберкулезного иммунитета у крупного рогатого скота на основе взаимосвязей в системе иммунитета: перспектива использования в ветеринарии» (одобренны решением подсекции «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины СО РАСХН, протокол № 5 от 10 января 2003 г.).

3. «Комплекс противозoonотических мероприятий по профилактике и ликвидации хронических болезней животных» (одобренны секцией животноводства Центра научного обеспечения АПК Омской области, протокол №9 от 15 ноября 2008 г.).

4. «Оценка иммунного статуса у крупного рогатого скота при лейкозе» (одобренны решением секции «Инфекционная патология» отделения ветеринарной медицины РАСХН, протокол № 4 от 13 ноября 2009 г.).

5. «Оценка иммуномодулирующих свойств препаратов на их способность восстанавливать утраченную иммунологическую реактивность» (одобренны решением секции «Инфекционная патология» отделения ветеринарной медицины РАСХН, протокол № 2 от 19 апреля 2010 г.).

6. Монография «Иммунология, микробиология, эпизоотология бруцеллеза и туберкулеза животных» написана с учетом результатов проведенных исследований, может быть использована в научно-исследовательских учреждениях при разработке тематических планов научно-исследовательских работ, а также в учебном процессе ВУЗов ветеринарного и общепрофильного профиля.

СПИСОК

опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК

Минобрнауки РФ для публикации основных результатов диссертации

1. Бажин, М.А. Иммунопрофилактика в комплексе противотуберкулезных мероприятий / М.А. Бажин, Ю.И. Смолянинов, В.Г. Ощепков, Н.Н. Кошечев, А.Н. Новиков, В.С. Власенко, А.С. Куварин // Ветеринарная патология. – № 1-2. – 2004. – С. 139-142.

2. Власенко, В.С. Перспектива использования дискретно-динамического принципа оценки иммунного статуса в ветеринарии / В.С. Власенко, М.А. Бажин, А.Н. Новиков // Ветеринарная патология. – 2005. – № 3. – С. 90-94.

3. Власенко, В.С. Оценка иммуномодулирующих свойств препаратов на их способность восстанавливать утраченную иммунологическую реактивность / В.С. Власенко, М.А. Бажин, А.Н. Новиков, Е.М. Шулико // Ветеринарная патология. – 2007. – № 3. – С. 195-199.

4. Власенко, В.С. Выявление животных с повышенным риском к заболеванию вирусом лейкоза крупного рогатого скота / В.С. Власенко, Т.С. Дудолодова, М.А. Бажин, А.Н. Новиков // Ветеринария и кормление. – 2008. – №4. – С. 8-9.

5. Власенко, В.С. Иммуномодулирующие свойства препаратов, изготовленных на основе антигенов вакцинного штамма БЦЖ и полиэлектролитов / В.С. Власенко, М.А. Бажин, А.Н. Новиков, Е.М. Шулико // Сиб. вестник с.-х. науки. – 2008. – №10. – С.68-73.

6. Власенко, В.С. Оценка иммуномодулирующей способности известных и вновь синтезируемых препаратов / В.С. Власенко, М.А. Бажин, А.Н. Новиков // Ветеринария и кормление. – 2009. – №4. – С. 18-19.

7. Пагула, Ю.И. Ускоренный метод визуализации восстановленного нитросинего тетразолия для оценки функциональной активности нейтрофилов / Ю.И. Пагула, В.С. Власенко // Ветеринария и кормление. – 2009. – №4. – С. 20-21.

8. Власенко, В.С. Оценка иммунного статуса крупного рогатого скота при лейкозе / В.С. Власенко, М.А. Бажин // Сиб. вестник с.-х. науки. – 2009. – №9. – С. 64-69.

9. Власенко, В.С. Иммуностимулирующие свойства конъюгатов, изготовленных на основе антигенов БЦЖ с поливинилпирролидоном / В.С. Власенко, Е.М. Шулико, С.Ю. Петров, М.А. Бажин, А.Н. Новиков // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – №12. – С. 47-50.

Патенты

10. Пат. 2257913 Российская Федерация, МПК⁷ А61К 39/00, G01N 33/53. Способ оценки иммунитета привитого молодняка крупного рогатого скота / Бажин М.А., Донченко Н.А., Власенко В.С., Новиков А.Н., Шамов В.В.; заявитель и патентообладатель Всерос. науч.-исслед. ин-т бруцеллеза и туберкулеза животных. – № 2003101186; заявл. 16.01.03; опубл. 10.08.05, Бюл. № 22. – 16 с.

11. Пат. 2266753 Российская Федерация, МПК⁷ А61К 39/04. Способ профилактики туберкулеза / Бажин М.А., Ощепков В.Г., Новиков А.Н., Власенко В.С., Темиркалин Т.Т.; заявитель и патентообладатель Всерос. науч.-исслед. ин-т бруцеллеза и туберкулеза животных. – № 20041111058; заявл. 12.04.04; опубл. 27.12.05, Бюл. № 36. – 6 с.

12. Пат. 2354401 Российская Федерация, МПК А61К 39/04, А61D 99/00. Способ оценки иммуномодулирующих препаратов / Бажин М.А., Власенко В.С., Новиков А.Н.; заявитель и патентообладатель Всерос. науч.-исслед. ин-т бруцеллеза и туберкулеза животных. – № 2007128669; заявл. 25.07.07; опубл. 10.05.09, Бюл. № 13. – 7 с.

13. Пат. 2366455 Российская Федерация, МПК А61К 39/04, С12N 1/20, С12R 1/32. Способ получения специфического иммуномодулятора / Бажин М.А., Власенко В.С., Новиков А.Н., Неворова Г.П., Шулико Е.М., Реутова Т.С.; заявитель и патентообладатели: Министерство сельского хозяйства и продовольствия Омской области, Всерос. науч.-исслед. ин-т бруцеллеза и туберкулеза животных. – № 2007139594; заявл. 25.10.07; опубл. 10.09.09, Бюл. № 25. – 8 с.

14. Пат. 2379683 Российская Федерация, МПК G01N 33/48. Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота / Бажин М.А., Власенко В.С., Дудолодова Т.С., Новиков А.Н.; заявитель и патентообладатель Всерос. науч.-исслед. ин-т бруцеллеза и туберкулеза животных. – № 2008122655; заявл. 04.06.08; опубл. 20.01.10, Бюл. № 2. – 6 с.

15. Пат. 2408018 Российская Федерация, МПК G01N 33/48. Способ оценки иммунного статуса крупного рогатого скота при лейкозе / Власенко В.С., Околелов В.И., Бажин М.А., Новиков А.Н.; заявитель и патентообладатель Всерос. науч.-исслед. ин-т бруцеллеза и туберкулеза животных. – № 2008150888; заявл. 22.12.08, опубл. 27.12.2010, Бюл. № 36. – 9 с.

16. Способ определения функциональной активности нейтрофилов по реакции восстановления нитросинего тетразолия / Пацула Ю.И., Власенко В.С., заявитель и патентообладатели Всерос. науч.-исслед. ин-т бруцеллеза и туберкулеза животных, Муниципальное учреждение здравоохранения Городская детская клиническая больница №2 имени В.П. Бисяриной. – № 2009117416; заявл. 07.05.09, опубл. 27.03.2011, Бюл. №9. – 5 с. (решение о выдаче патента на заявку №2009117416 от 5 мая 2010 г.)

Монография, рекомендации

17. Колычев, Н.М. Иммунология, микробиология, эпизоотология бруцеллеза и туберкулеза животных: монография / Н.М. Колычев, М.А. Бажин, А.А. Новицкий, В.С. Власенко. – Омск: Изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2007. – 377 с.

18. Бажин, М.А. Методы оценки противотуберкулезного иммунитета у крупного рогатого скота на основе взаимосвязей в системе иммунитета: перспектива использования в ветеринарии: методические рекомендации / М.А. Бажин, Н.А. Донченко, В.С. Власенко, А.Н. Новиков. – РАСХН. Сиб. отд-ние. ГНУ ВНИИБТЖ, ГНУ ИЭВСидВ. – Омск, 2005. – 13 с.

19. Бажин, М.А. Дискретно-динамический анализ в оценке иммунитета: методические рекомендации / М.А. Бажин, В.С. Власенко, А.Н. Новиков, Ю.И. Пацула. – СО РАСХН. ВНИИБТЖ. – Омск, 2005. – 24 с.

20. Ощепков, В.Г. Комплекс противозoonотических мероприятий по профилактике и ликвидации хронических болезней животных: методические рекомендации / В.Г. Ощепков, М.А. Бажин, Л.В. Дегтяренко, В.Ф. Бордюг, Н.С. Боганец, Л.А. Таллер, А.Н. Новиков, В.С. Власенко и др. – СО Россельхозакадемии. ВНИИБТЖ. – Омск, 2008. – 36 с.

21. Власенко, В.С. Оценка иммунного статуса у крупного рогатого скота при лейкозе: методические рекомендации / В.С. Власенко, М.А. Бажин, Т.С. Дудолова, А.Н. Новиков, В.А. Мироненко. – ГНУ ВНИИБТЖ Россельхозакадемии; ГНУ СО Россельхозакадемии. – Омск, 2010. – 31 с.

22. Бажин, М.А. Оценка иммуномодулирующих свойств препаратов на их способность восстанавливать утраченную иммунологическую реактивность / М.А. Бажин, В.С. Власенко, А.Н. Новиков, Е.М. Шулико. – ГНУ ВНИИБТЖ Россельхозакадемии; ГНУ СО Россельхозакадемии. – Омск, 2010. – 12 с.

Работы, опубликованные в сборниках научных трудов, материалах конференций и других изданиях

23. Власенко, В.С. Взаимосвязи в системе иммунитета у интактных и привитых вакциной БЦЖ телят / В.С. Власенко, М.А. Бажин // Инфекционная патология животных: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2001. – С. 198-202.

24. Власенко, В.С. Дискретно-динамический анализ в оценке противотуберкулезного иммунитета у молодняка крупного рогатого скота / В.С. Власенко, В.В. Шамов // Научное обеспечение АПК Сибири, Монголии, Казахстана, Беларуси и Башкортостана: Матер. 5-ой Междунар. науч.- практ. конф. (Абакан, 10-12 июля 2002 г.) / РАСХН. Сиб. отд.-ние. – Новосибирск, 2002. – С. 382-384.
25. Бажин, М.А. Составление дифференциально-прогностических таблиц на основе дискретно-динамического принципа оценки иммунного статуса / М.А. Бажин, В.С. Власенко, А.Н. Новиков // Эпизоотология, диагностика и профилактика хронических инфекционных болезней животных: Матер. Междунар. науч. конф. посвященной 175-летию аграрной науки Сибири (Омск, 24-26 июня 2003 г.): сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2003. – С. 97-108.
26. Власенко, В.С. Оценка иммунного статуса интактных и привитых вакциной БЦЖ животных с помощью дифференциально-прогностических таблиц / В.С. Власенко, М.А. Бажин // Эпизоотология, диагностика и профилактика хронических инфекционных болезней животных: Матер. Междунар. науч. конф. посвященной 175-летию аграрной науки Сибири (Омск, 24-26 июня 2003 г.): сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2003. – С. 109-115.
27. Власенко, В.С. Оценка иммунного статуса молодняка крупного рогатого скота, привитого БЦЖ, на основе взаимосвязей в системе иммунитета / В.С. Власенко, М.А. Бажин // Там же. – С. 116-122.
28. Власенко, В.С. Дискретно-динамический принцип оценки иммунного статуса животных / В.С. Власенко // Эпизоотология, патология и ветеринарно-санитарные мероприятия при инфекционных болезнях животных: Матер. Междунар. науч.-практич. конф. посвященной 35-летию СО РАСХН: сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2004. – С. 22-27.
29. Власенко, В.С. Взаимосвязи в системе иммунитета у здорового, реагирующего и больного туберкулезом крупного рогатого скота / В.С. Власенко, М.А. Бажин, А.С. Куварин, А.Н. Новиков, В.Ф. Бордог // Эпизоотология, патология и ветеринарно-санитарные мероприятия при инфекционных болезнях животных: Матер. Междунар. науч.-практич. конф. посвященной 35-летию СО РАСХН: сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2004. – С. 28-33.
30. Бажин, М.А. Вакцинопрофилактика в комплексе противотуберкулезных мероприятий / М.А. Бажин, В.С. Власенко, А.С. Куварин, А.Н. Новиков // Мат. Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию со дня рождения И.Г. Кондюрин / ФГОУ ОмГАУ. – Омск, 2004. – С. 345-350.
31. Власенко В.С. Математическое моделирование в иммунологии / В.С. Власенко // Мат. Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию со дня рождения И.Г. Кондюрин / ФГОУ ОмГАУ. – Омск, 2004. – С. 361-365.
32. Бажин, М.А. Взаимосвязи в системе иммунитета у морских свинок, инфицированных различными видами микобактерий / М.А. Бажин, В.А. Шкурин, В.С. Власенко, А.С. Куварин, А.Н. Новиков // Мат. 4-й межрег. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию со дня рождения И.В. Окунцева: сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2005. – С. 28-32.
33. Куварин, А.С. Иммунный статус у коров, не реагирующих и реагирующих на ИПД-туберкулин и привитых вакциной БЦЖ / А.С. Куварин, А.Н. Но-

виков, М.А. Бажин, В.С. Власенко // Ветеринарна медицина: Межвід. темат. наук. збірник.- Харків, 2005. – Т. 1. – С. 627-631.

34. Бажин, М.А. Микобактериозы крупного рогатого скота и их профилактики / М.А. Бажин, Ю.И. Смолянинов, Н.Н. Кощев, В.Ф. Бордюг, В.С. Власенко // Тезисы докладов Междунар. науч.-практ. конгресса (актуальные проблемы ветеринарной медицины 29-30 августа 2005 г), Спб., 2005. – С. 44-45.

35. Власенко, В.С. Функционирование иммунной системы у интактного и привитого вакциной БЦЖ крупного рогатого скота / В.С. Власенко, М.А. Бажин, А.Н. Новиков, А.В. Миронов // Аграрная наука сельскохозяйственному производству Сибири, Монголии, Казахстана и Кыргызстана: Матер. 8-ой Междунар. науч.- практ. конф. (Барнаул, 26-28 июля 2005 г.) / РАСХН. Сиб. отд.- Новосибирск, 2005. – Т. 2. – С. 252-254.

36. Власенко, В.С. Оценка иммунного статуса коров, привитых БЦЖ, интактных и больных туберкулезом / В.С. Власенко, А.Н. Новиков, М.А. Бажин // Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний: Матер. Междунар. симпозиума, посвященного 45-летию образования ФГУ ФЦТРБ – ВНИВИ (28-30 ноября 2005 года) / Казань, 2005. – Т. 2. – С. 80-83.

37. Пацула, Ю.И. Реакции клеточного иммунитета у морских свинок при экспериментальном микобактериозе / Ю.И. Пацула, В.С. Власенко, А.Н. Новиков, М.А. Бажин, А.С. Куварин // Актуальные вопросы инфекционной патологии: Матер. юбилейной науч.-практ. конф., посвященной 75-летию кафедр инфекционных болезней взрослых и детей ОмГМА (Омск, 20-21 декабря 2005 г) / Омский научный вестник. – 2005. – № 4 (Приложение к Вып. 33). – С. 89-90.

38. Бажин, М.А. Клеточные реакции у морских свинок, инфицированных различными видами микобактерий / М.А. Бажин, В.С. Власенко, А.С. Куварин, А.Н. Новиков, Ю.И. Пацула, Н.Н. Кощев // Актуальные проблемы ветеринарной медицины продуктивных и непродуктивных животных: Матер. 5-й межрег. науч.-практ. конф.: сб. науч. тр. / Омск, 2006. – С. 15-18.

39. Власенко, В.С. Динамика содержания иммунологических параметров и их взаимосвязи в системе иммунитета крупного рогатого скота, привитого вакциной БЦЖ / В.С. Власенко, А.В. Миронов, М.А. Бажин, А.Н. Новиков, С.В. Савицкий // Актуальные проблемы ветеринарной медицины продуктивных и непродуктивных животных: Матер. 5-й межрег. науч.-практ. конф.: сб. науч. тр. / Омск, 2006. – С. 42-47.

40. Власенко, В.С. Анализ взаимосвязей в системе иммунитета молодняка крупного рогатого скота, привитого вакциной БЦЖ / В.С. Власенко, А.Н. Новиков, М.А. Бажин, С.В. Савицкий // Патология сельскохозяйственных животных и пути ее профилактики: Матер. 6-й межрег. науч.-практ. конф. посвященные 85-летию СибНИВИ-ВНИИБТЖ. Вып. 2. – Омск, 2007. – С. 51-54.

41. Власенко, В.С. Методы контроля активной фазы иммунного ответа / В.С. Власенко // Матер. межрегиональной науч.-практ. конф. «Дни иммунологии в Сибири» (Омск, 26-28 сентября 2007 г) / Омский научный вестник. – 2007. – № 3 (Приложение 2). – С. 328-330.

42. Власенко, В.С. Реакции клеточного иммунитета у морских свинок на введение антигенных комплексов / В.С. Власенко, А.Н. Новиков, М.А. Бажин, Ю.И. Пацула // Диагностика, лечение и профилактика болезней животных в условиях Сибири и Урала: Матер. 7-й межрег. науч.-практ. конф., посвященной 180-летию аграрной науки Сибири. – Омск, 2008. – С. 78-81.

43. Власенко, В.С. Иммунный статус инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота / В.С. Власенко, Т.С. Дудолодова, М.А. Бажин, А.Н. Новиков, В.А. Мироненко // Развитие АПК Азиатских территорий: Тр. XI-й Междунар. науч.-практ. конф. (Новосибирск, 25-27 июня 2008 г.) / Россельхозакадемия. Сиб. отд-ние. – Новосибирск, 2008. – Т. II. – С. 48-51.

44. Бажин, М.А. Протективные свойства конъюгатов, приготовленных на основе антигенов БЦЖ и синтетических полиэлектролитов / М.А. Бажин, В.С. Власенко, А.Н. Новиков, Е.М. Шулико, С.Ю. Петров // Современные проблемы диагностики и профилактики хронических зооантропонозных инфекций: Матер. Всерос. науч.-практ. конф. – Омск, 2009. – С. 99-102.

45. Власенко, В.С. Функциональное состояние иммунной системы у коров, нереагирующих и реагирующих на ППД-туберкулин и привитых БЦЖ / В.С. Власенко, Ю.И. Пацула, В.А. Мироненко // Современные проблемы диагностики и профилактики хронических зооантропонозных инфекций: Матер. Всерос. науч.-практ. конф. – Омск, 2009. – С. 112-116.

46. Власенко, В.С. Иммунный статус у здорового и родившегося от матерей, инфицированных вирусом лейкоза, молодняка крупного рогатого скота / В.С. Власенко, Т.С. Дудолодова, М.А. Бажин, А.Н. Новиков, В.А. Мироненко // Патология продуктивных и непродуктивных животных, рыб и птиц: Матер. 8-й межрег. науч.-практ. конф. – Омск, 2009. – С. 23-29.

47. Власенко, В.С. Характеристика иммунного статуса морских свинок, инфицированных *M. bovis* / В.С. Власенко // Актуальные проблемы инновационного развития ветеринарной науки и практики: Матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 105-летию КазНИВИ (Алматы, 16-17 сентября 2010 г.). – Алматы, 2010. – Т. 56. – С. 95-99.

48. Власенко, В.С. Иммунологические изменения у инфицированного вирусом лейкоза и больного лейкозом крупного рогатого скота / В.С. Власенко // Актуальные проблемы инфекционных и незаразных патологий животных: Матер. X Междунар. науч.-практ. конф. (Омск, 21-22 сентября 2010 г.). – Омск, 2010. – С. 209-212.

Типография ОмГУПСа, 2011. Тираж 100 экз. Заказ 288.
644046, г. Омск, пр. Маркса, 35.