

Министерство образования и науки Кыргызской Республики

**Кыргызский национальный аграрный университет
имени К.И. Скрябина**

Диссертационный совет Д.06.16.538

На правах рукописи
УДК 616. 2 (075)

ЕЛЕКЕЕВ ТОКСЕЙТ АРТЫКБАЙУЛЫ

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЕЗА ЖИВОТНЫХ**

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

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

БИШКЕК - 2017

Диссертационная работа выполнена в лаборатории эпизоотологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева и в филиале «Южно-Казахстанская научно-исследовательская ветеринарная станция» ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт» АО «Казагроинновация».

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Тургенбаев Кайрат Алтынбекович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Арбаев Кубан Султанович

кандидат ветеринарных наук
Кельдибекова Замира Садыбакасовна

Ведущая организация: **Институт Биотехнологии Национальной Академии наук Кыргызской Республики**

Защита диссертации состоится «27» апреля 2017 г. в 10.00 на заседании диссертационного совета Д.06.16.538 при Кыргызском национальном аграрном университете им. К.И. Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. О. Медерова, 68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина по адресу: 720005, Бишкек, ул. О. Медерова, 68. Электронный адрес сайта: <http://knaau.kg/ru/>

Автореферат разослан «_____» марта 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук, доцент

Крутская Е.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одной из ведущих, наиболее сложных и экономически значимых проблем в инфекционной патологии животных является туберкулез. Данная инфекция наносит значительный экономический ущерб народному хозяйству как вследствие вынужденного убоя больных и реагирующих на туберкулин животных (возможно не являющихся больными), так и из-за утери работоспособного населения государства. Поэтому очевидна необходимость проведения комплексных мероприятий по борьбе с туберкулезом (Хазипов Н.З., Сафин М.А., Идрисов Г.З., 1985; Овдиенко Н.П., 1990; Иванов Н.П., Тургенбаев К.А., 2013; Uneand Y., Mori T., 2007).

Решающая роль в системе противозoonотических мероприятий при туберкулезе животных принадлежит диагностике.

Арсенал средств и методов диагностики туберкулеза достаточно богат и разнообразен, разработка и совершенствование которых продолжается со времен открытия возбудителя. Однако решающими в диагностике туберкулеза являются патологоанатомический и бактериологический методы исследований, а положительные результаты туберкулиновой пробы при плановом обследовании скота в благополучных хозяйствах требуют подтверждения этими методами для исключения заболевания. Туберкулез считается установленным при обнаружении у животных на вскрытии изменений или выделении возбудителя туберкулеза (Тургенбаев К.А., 2001; Жумаш А.С., Тургенбаев К.А., 2005; Fatima N., 2009).

Диагностическое значение имеет только наличие или отсутствие в исследуемом материале возбудителя туберкулеза. В то же время отрицательные результаты бактериологического исследования не всегда подтверждаются отсутствием туберкулеза (Таллер Л.А., 1995; Жумашев А.С., Карабекова С.С., 2000).

Вместе с тем, выделение микобактерий туберкулеза из биологического материала связано с определенными трудностями в силу биологических и таксономических особенностей возбудителя, в том числе в сравнении с другими микроорганизмами, медленным ростом на питательных средах и длительностью постановки биологической пробы на лабораторных животных. Несмотря на успехи, достигнутые наукой и практикой в вопросах бактериологической диагностики, на современном этапе в связи с установленным фактом эволюционной изменчивости возбудителя, широким и зачастую бесконтрольным применением лекарственных средств и биопрепаратов, экологическим и техногенным прессом, а также коренными преобразованиями ведения животноводства в стране в значительной мере снизилась эффективность и информативность бактериологического исследования при туберкулезе животных (Арсенин С.Л., Никулин Б.А., Кишкун А.О., 2002; Konstantinos A., 2010; Овдиенко Н.П., 1990).

В связи с этим усовершенствование метода диагностики туберкулеза в современных условиях ведения животноводства и внедрение его в ветеринарную практику представляется весьма актуальным.

Связь темы диссертации с крупными научными программами, основными научно-исследовательскими работами, проводимыми научными учреждениями

Работа выполнена в период с 2006 по 2016 годы в лаборатории эпизоотологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева (КНИИВ) в соответствии с НИР по темам: «Эпизоотологический мониторинг инфекционных болезней и разработка универсальной, асоциированной адъювант-вакцины против пастерелллезных и сальмонеллезных инфекций» (2005-2009), «Эпизоотологический мониторинг бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных и разработка мер борьбы с ними применительно к фермерским, крестьянским, кооперативным хозяйствам» (2010-2014) и «Эпизоотический мониторинг инфекционных болезней сельскохозяйственных животных с применением классических и современных методик. Гармонизация противоэпизоотических мероприятий согласно требований МЭБ, ВОЗ в условиях рыночной экономики» (2015-2018), № госрегистрации 0007142; а также в филиале «Южно-Казахстанская научно-исследовательская ветеринарная станция» ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт» в соответствии с заданием О. 0502 (28) «Оценка рисков распространения, диагностика и профилактика инфекционных и инвазионных болезней животных и птиц» в соответствии с бюджетной программой 042 «Прикладные научные исследования в области агропромышленного комплекса» по теме: «Анализ эпизоотической ситуации и классификация территорий РК по категориям биологической опасности» часть 2 «Разработать комплекс мер по обеспечению устойчивого благополучия хозяйств республики от туберкулеза сельскохозяйственных животных» № госрегистрации 0109РК01035.

Цель и задачи исследования - усовершенствование метода диагностики туберкулеза животных и внедрение его в ветеринарную практику.

На решение были поставлены следующие задачи:

1. разработать методику получения антигена для ККРА (кровокапельная реакция агглютинации);
2. получение гипериммунной сыворотки;
3. методика постановки ККРА;
4. диагностика туберкулеза животных методом ККРА в производственных условиях;
5. разработка питательной среды для ускоренного культивирования микобактерий.

Научная новизна

- разработан способ получения антигена для постановки реакций ККРА;
- для практических ветеринарных лабораторий предложена экспресс-диагностика туберкулеза животных (ККРА);
- разработана и внедрена рекомендация по диагностике туберкулеза животных кровокапельной реакцией агглютинации (ККРА) (Приложение 1), утвержденные на Ученом Совете ТОО «Казахский научно-исследовательский

ветеринарный институт» АО «КазАгроИнновация» (протокол № 4 от 26.10.2010), 10 с.;

- разработана питательная среда для ускоренного культивирования микобактерий.

Практическая значимость полученных результатов. Для практических ветеринарных работников, районных и областных лабораторий предложена экспресс-диагностика туберкулеза животных. Применение экспресс-диагностики позволяет сократить сроки постановки диагноза на туберкулез, автоматизировать и унифицировать процесс исследования.

Экономическая значимость полученных результатов. Проведение противотуберкулезных мероприятий в хозяйствующих субъектах с применением для диагностики ККРА у животных позволит предотвратить преждевременной убой хозяйственно ценных животных.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. метод получения антигена для ККРА;
2. постановка ККРА;
3. результаты апробации метода ККРА микобактерий при диагностике туберкулеза животных;
4. питательная среда для ускоренного культивирования микобактерий.

Личный вклад соискателя. Диссертантом для диагностики туберкулеза животных освоены аллергические, бактериологические, биохимические, иммунологические методы исследований, которые были успешно применены в научно-исследовательской работе. Все основные разделы диссертации были выполнены самостоятельно.

Апробация результатов исследования. Материалы диссертации доложены и обсуждены на: международной научно-практической конференции «Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых учёных» (Новосибирск, пос. Краснообск, 2010), на юбилейной конференции фтизиатров Казахстана «80-лет Национальному центру проблем туберкулеза РК» (Алматы, НЦПТ, 2012), конференции посвященной 70-летию юбилею Аманбаева Ж.Б. (Бишкек, КНАУ, 2016), в трудах КазНИВИ, КНАУ, КНИИВ, КыргНИИЖП, в журнале «Вестник Алтайского государственного университета».

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. По материалам диссертации опубликовано 11 трудов, в т.ч. рекомендация, которые изложены в материалах международных конференций, сборниках научных трудов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 148 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, заключения, списка литературы и приложений, включающих 272 библиографических источников литературы отечественных и зарубежных авторов. Материалы диссертации иллюстрированы 17 таблицами, 24 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследований, необходимость разработки экспресс-диагностики туберкулеза животных.

В главе 1 «Обзор литературы» по материалам отечественных и зарубежных публикаций дается характеристика возбудителей туберкулеза и других микобактерий, традиционных методов борьбы с туберкулезом животных и системы борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота (вакцинопрофилактика и химиопрофилактика).

В главе 2 «Материалы и методы исследований» дана характеристика материалов и объектов исследований, методического подхода к выполнению исследований.

Работа выполнена в период с 2006 по 2016 годы в лаборатории эпизоотологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева (КНИИВ) в соответствии с НИР лаборатории эпизоотологии по темам: «Эпизоотологический мониторинг инфекционных болезней и разработка универсальной, асоциированной адъювант-вакцины против пастереллезных и сальмонеллезных инфекций» (2006-2010), «Эпизоотологический мониторинг бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных и разработка мер борьбы с ними применительно к фермерским, крестьянским, кооперативным хозяйствам» (2010-2014), «Эпизоотический мониторинг инфекционных болезней сельскохозяйственных животных с применением классических и современных методик. Гармонизация противоэпизоотических мероприятий согласно требований МЭБ, ВОЗ в условиях рыночной экономики» (2015-2018) и в соответствии с НИР лаборатории туберкулеза филиала КазНИВИ «Южно-Казахстанская НИВС» О. 0502 (28) «Оценка рисков распространения, диагностика и профилактика инфекционных и инвазионных болезней животных и птиц» в соответствии с бюджетной программой 042 «Прикладные научные исследования в области агропромышленного комплекса» по теме: «Анализ эпизоотической ситуации и классификация территорий РК по категориям биологической опасности» часть 2 «Разработать комплекс мер по обеспечению устойчивого благополучия хозяйств республики от туберкулеза сельскохозяйственных животных».

В работе использовались результаты лабораторных и производственных исследований.

Объектом для исследований были лабораторные животные (кролики и морские свинки), верблюды, крупный рогатый скот, биоматериалы: цельная кровь, сыворотка, культуры микобактерий: (*M. tuberculosis*, *M. bovis*).

Методы: в данной работе были использованы экспресс-методы - ПЦР (полимеразно-цепная реакция), ИФА (иммуноферментный анализ) и ККРА (кровокапельная реакция агглютинации) в сравнении с общепринятыми классическими (бактериологическими) методами диагностики данной инфекции а также внутрикожной туберкулиновой пробой (ВТП) – с применением ППД-туберкулина для млекопитающих.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В главе 3 «Результаты собственных исследований» представлены результаты проведения освежения культур микобактерий для использования в разработке антигена с целью подтверждения их исходных типовых свойств, накопление бактериальной массы микобактерий для приготовления антигена, получение микобактериальных антигенов, отработка различных методов иммунизации подопытных кроликов при получении гипериммунных сывороток, разработка метода экспресс-диагностики туберкулеза животных, испытание эффективности ККРА при диагностике туберкулеза животных в производственных условиях и разработка питательной среды для ускоренного культивирования микобактерий.

В начале опыта нами были выбраны и освежены культуры микобактерий для приготовления антигена для экспресс-диагностики туберкулеза животных.

Культуры *M. bovis* и *M. avium* использовались при приготовлении антигена для ККРА. В связи с этим вначале исследований много внимания уделялось проведению полного биологического контроля данных культур для подтверждения исходных типовых свойств.

У культур были изучены: сроки обнаружения первичного роста, характеристика колоний, пигментообразование, тинкториальные и биохимические свойства (каталаза и пероксидаза), лекарственная чувствительность микобактерий, для их дифференциации использованы амиды – ацетамид, мочевины, никотинамид, пиразинамид, алантоин, сукцинамид. Исходные типовые свойства вышеуказанных штаммов подтверждали с помощью ПЦР и биологической пробой.

Накопление бактериальной массы микобактерий для приготовления антигена

Для проведения исследований мы использовали выше изученные культуры микобактерий. Нами готовились питательные среды, затем в бактериологическом боксе с соблюдением мер асептики и антисептики на поверхность приготовленных питательных сред наносили культуры микобактерий, необходимые для проведения эксперимента.

Первоначально были проведены высевы культур на яичные питательные среды Левенштейна-Йенсена. Перенос культур микобактерий из пробирок со штаммами в пробирки и колбы с питательными средами производился при помощи одноразовой бактериологической петли.

Для качественного осуществления посева на плотную питательную среду Левенштейна-Йенсена предварительно бактериологическую петлю погружали в остаточную жидкость (конденсат) на дне пробирки со свежеприготовленной питательной средой. Смоченную таким образом петлю вносили в пробирку с требуемой культурой и осторожным движением забирали часть выросшей культуры.

После этого посевной материал перемещался в пробирку с подготовленной для посева питательной средой, который наносился зигзагообразными движениями от дна пробирки к концу «косы» таким образом,

чтобы часть его попала в конденсат. Это позволило достичь правильного, равномерного распределения выросшей культуры на поверхности питательной среды.

Пробирки с посевами термостатировали при 37 °С до появления видимого роста культуры микобактерий, но не менее 30 сут.

Затем культуры адаптировали к жидкой картофельной питательной среде Павловского. Колонии культур вносили на поверхность картофеля и выдерживали в термостате при 37 °С до получения устойчивого роста пленки микобактерий на поверхности жидкой части среды.

Затем пленку культуры микобактерий осторожно переносили на другую среду Павловского и через три пассажа, полученные пленки бактериальной массы микобактерий, пересевали на синтетическую среду Сотона.

Пересев проводили следующим образом: бактериологической лопаткой пассированную культуру осторожно переносили в литровые колбы с приготовленной заранее питательной средой Сотона таким образом, чтобы пленка культуры легко снялась с лопаточки и равномерно распределилась по поверхности питательной среды. Колбы с пересеянными культурами помещали в термостат для инкубации при температуре 37 °С.

Таким образом, к питательной среде Сотона адаптировано 2 вида микобактерий туберкулеза – *M. bovis* и *M. avium*. Получено по 20–30 г бактериальной массы каждого вида микобактерий.

Получение микобактериальных антигенов

Автоклавированную микобактериальную массу отмывали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин 5 раз в физиологическом растворе. Для удаления свободных липидов, микробные клетки дважды обрабатывали ацетоном в соотношении 1:2, затем из нее готовили суспензию из расчета 1 г бактериальной массы на 100 см³ физиологического раствора. После этого проводили ультразвуковую дезинтеграцию бактериальной массы в течение 10 мин при частоте 22 кГц.

Озвученный антиген фильтровали через стерилизующие фильтры, дважды отмывали стерильным физиологическим раствором путем центрифугирования в течение 30 мин при 3000 об/мин. Осадок ресуспензировали физиологическим раствором. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда при длине волны 590 нм на спектрофотометре S-30 BOECO (Germany). В результате концентрация белка составила до 1 мг/см³.

Отработка различных методов иммунизации подопытных кроликов при получении гипериммунных сывороток

В ветеринарной практике особое значение имеет диагностика туберкулеза как руководящей инфекции, оказывающей существенное влияние на формирование эпизоотической обстановки в хозяйствующих субъектах. Однако классический, являющийся основным, метод диагностики – туберкулиновая проба не способен дать ответ на основной вопрос: микобактериальные культуры какого вида (относящегося к патогенным либо атипичным) обусловили аллергическую реакцию на примененный туберкулин, и было ли

это вообще реакцией на присутствие в организме животного сенсibilизирующих агентов микобактериальной природы. Нередки случаи, когда при патологоанатомическом вскрытии реагировавших на туберкулин животных обнаруживались не туберкулезные, а, к примеру, эхинококковые поражения. В свете изложенного, особо актуальной нам видится проблема дифференциальной диагностики туберкулеза, позволяющей с высокой степенью достоверности выявлять больных животных и бактерионосителей.

Для осуществления данного эксперимента нами был проведен опыт по получению гипериммунных сывороток из крови подопытных кроликов. Мы испытали разные методы иммунизации с тем, чтобы получить сыворотки с максимальным титром антител. В опыте были использованы культуры микобактерий видов *M. bovis*, *M. avium*.

Первоначально мы применили метод Б.Н. Козьмина-Соколова. Суть данного метода заключается в проведении двух циклов иммунизации, каждый из которых включал 4 внутривенные инъекции (производились в краевую ушную вену). Первая инъекция – 0,5 см³ взвеси, полученной из бактериальной массы, обезвреженной стерилизацией в течение 90 мин при 1 атм, дважды подвергнутой центрифугированию в течение 30 мин при 8000 об/мин, и ультразвуковой дезинтеграции в течение 10 мин в режиме 22 кГц. Начиная со второй инъекции, объем бактериальной взвеси составлял 1 см³. Инъекции проводились через 3 дня в каждом цикле с месячным интервалом между двумя циклами иммунизации. Отбор крови для получения гипериммунных сывороток производился через 3 недели после завершения иммунизации. Проведенная в качестве контроля титра полученных после завершения циклов иммунизации сывороток реакция ИФА показала крайне низкий титр антител в сыворотках крови кроликов, иммунизированных по методу Б.Н. Козьмина-Соколова, не превышавший 1:2. Данный результат был признан неудовлетворительным, что в сочетании со сложностью применения описанной схемы дало нам основание отказаться от дальнейшего применения этого метода иммунизации и заняться изысканием более эффективных и удобных в применении способов.

В экспериментальных целях был применен метод иммунизации, описанный М.В. Макаровой. Он заключался в иммунизации кроликов бактериальной взвесью, приготовленной по вышеописанной схеме, подкожно в шесть точек спины последовательно вдоль позвоночного столба. Объем вводимой взвеси составлял 3 см³ суммарно для каждого кролика, то есть 0,5 см³ в каждую точку введения. Иммунизация проводилась в два цикла. Каждый цикл иммунизации состоял из трех введений с интервалом 2 недели. Интервал между двумя циклами составил 1 месяц. Кровь отбиралась, как и при использовании метода Б.Н. Козьмина-Соколова, через 3 недели после завершения последнего цикла иммунизации.

Данный метод отличался, в сравнении с методом Б.Н. Козьмина-Соколова, простотой и удобством применения, несмотря даже на увеличившиеся сроки иммунизации (3 месяца против 50 дней). По данным М.В. Макаровой, этот способ обеспечивает получение гипериммунных сывороток с высокими титрами антител (в ИФА – от 1:8000 до 1:128000).

Однако проведенная нами серия иммунизации кроликов с применением метода М.В. Макаровой не дала положительного результата, так как при постановке ИФА с полученными в результате опыта сыворотками были зафиксированы низкие титры антител – до 1:4–1:8.

В дальнейшем иммунизацию кроликов проводили по методу, описанному Harboe N., Ingild A. Готовили раствор антигена в концентрации 2-4 мг/мл с неполным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1. На 1-й, 14-й, 28-й и 43-й день иммунизации кроликам вводили раствор антигена в объеме 1 мл. Иммунизацию производили в участок кожи над лопаткой в 8-10 точках. На 50-й день отбирали кровь из ушной вены. Специфичность антисывороток проверяли в ИФА с полученными нами антигенами.

В результате был определен титр антител в сыворотках, в разведении 1:2 равный 1:7680, а в сыворотках в разведении 1:100 – 1:6400.

Титры антител при применении разных методов иммунизации с использованием антигенов из культур *M. bovis* и *M. avium* приведены на рисунке 1. Данный результат свидетельствует о достаточно высокой эффективности примененного нами метода иммунизации кроликов бактериальной взвесью с неполным адьювантом Фрейнда, а удобство применения и высокая скорость получения результатов иммунизации (17 дней) делают этот метод весьма привлекательным для практических специалистов ветеринарных лабораторий и научно-исследовательских институтов.

Таким образом, учитывая высокую эффективность метода иммунизации подопытных кроликов с применением бактериальной взвеси, смешанной с неполным адьювантом Фрейнда, его простоту и удобство применения, а также быстроту проведения полного цикла иммунизации, можно рекомендовать его в качестве основного при проведении аналогичных исследований.

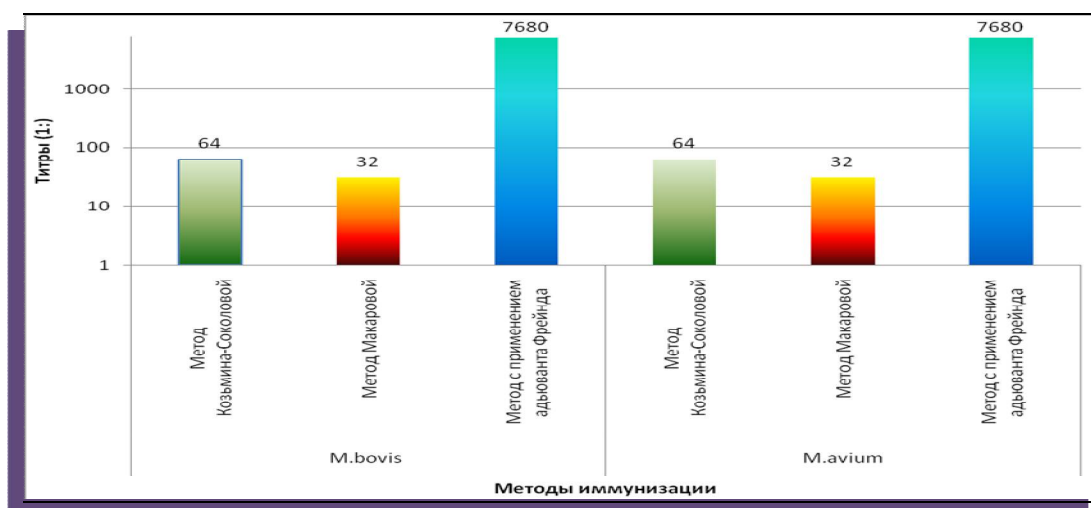


Рис. 1. Результаты различных методов иммунизации

Примечание: 1 - метод Козьмина-Соколова; 2 - метод Макаровой; 3 - метод N. Harboe, A. Ingild с применением адьюванта Фрейнда

Разработка экспресс-диагностики туберкулеза животных

Комплексное применение экспресс-методов позволяет своевременно устанавливать диагноз на туберкулез и своевременно проводить оздоровительные ветеринарно-санитарные мероприятия в хозяйствах.

В дальнейшем нами была проведена работа по сравнению методов диагностики туберкулеза, таких как ПЦР (полимеразно-цепная реакция), ИФА (иммуноферментный анализ) и ККРА (кровокапельная реакция агглютинации) в сравнении с общепринятыми классическими (бактериологическими) методами.

Для этой цели нами был проведен экспериментальный опыт на 30 морских свинок весом 300 г, разделенных на 6 групп, по 5 свинок в каждой. Морских свинок 1-й и 2-й группы заражали вирулентной культурой *M. tuberculosis* и *M. bovis*-8 в дозе 0,001 мг/кг в 1 см³ физиологического раствора внутримышечно, животных 3-6 групп заражали атипичными культурами (*M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. phlei*) в дозе 1 мг/кг 1 см³ физиологического раствора внутримышечно в область паха.

Животные, зараженные вирулентными культурами микобактерий пали от инфекционного процесса через 2-3 месяца. В эти же сроки был проведен убой и остальных морских свинок. Отобранный биоматериал подвергали предпосевной обработке для бактериологического исследования по методу Аликаевой. Каждую пробу высевали в 5 пробирок среды Левенштейна-Йенсена и Гельберга и готовили по 6 мазков-отпечатков. Один мазок окрашивали по Циль-Нильсену, другая часть проб биоматериала была исследована методом ПЦР с использованием тест-системы «МТБ-КОМ» и ИФА.

Активность и специфичность антител определяли в ИФА по отношению к волне 492 нм.

Результаты тестирования разработанного антигена в непрямом варианте иммуноферментного анализа приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты тестирования моноклональных антител

Антиген	Обратные величины титров специфических антител
<i>Mycobacterium M. bovis</i> шт. 8	1:25600
<i>Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv</i>	отрицательно
<i>Mycobacterium avium</i>	1:100
<i>Mycobacterium kansasii</i>	отрицательно
<i>Mycobacterium phlei</i>	отрицательно
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	отрицательно

Пробы крови, взятые перед убоем из сердца морских свинок, и выделенные изоляты от их органов подвергались подтверждению методом ПЦР с помощью набора «МТБ-КОМ», предназначенного для выявления ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*), выявляемых в культурах микроорганизмов, а также в различном биологическом материале.

Учет результатов ПЦР-анализа проводили по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК размером 390 пар нуклеотидов (п.н.), сравнение которых проводили по ПКО (положительному контрольному образцу) (рис. 2).

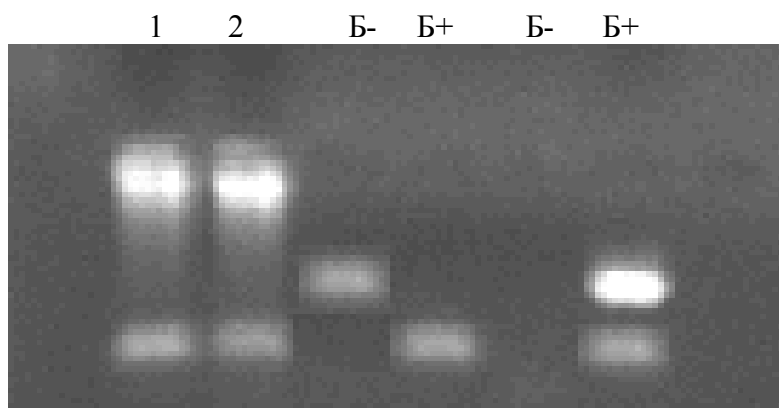


Рис. 2. Электрофореграмма ДНК микобактерий туберкулеза в биоматериале
Примечание: 1 – *M. tuberculosis*, 2 – *M. bovis*, Б - отрицательный контроль ПЦР (ДНК буфер), Б+ - положительный контроль

Согласно рисунку 2, в пробах под номерами 1, 2 наблюдаются специфические полосы размером 390 п.н. Мы получили молекулярно-генетическое подтверждение соответствия изолятов, выделенных от морских свинок штаммам, которыми ранее проводили заражение данных животных (рис. 3). Далее нами было получено подтверждение методом ПЦР изолята микобактерии *avium*, выделенной от морской свинки после заражения. Исследование проводили с помощью набора «АВИУМ» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора РФ.

После завершения амплификации пробы подвергались электрофоретической детекции в зоне № 3. Визуализацию продуктов ПЦР проводили на геледокументирующей системе *DNR MiniBis Pro* с применением комплекта реагентов «ЭФ». Результаты проведенной ПЦР с помощью комплекта «АВИУМ» представлены на рисунке 3.

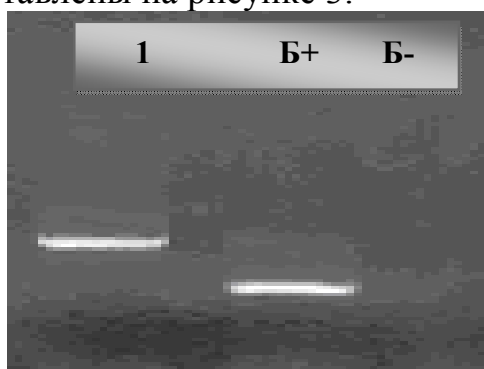


Рис. 3. Электрофорез продуктов ПЦР
Примечание: 1 – *M. avium*; Б - отрицательный контроль ПЦР (ДНК буфер); Б+ - положительный контроль

Результаты оценивались по наличию специфической полосы на уровне положительного контрольного образца. Как видно на рисунке 3, изолят,

выделенный от морской свинки, соответствует *M. avium*. Реакцию (ККРА) ставили на стекле путем смешивания капли крови с каплей микробного антигена. После тщательного смешивания антигена с сывороткой крови стекло покачивали круговыми движениями. Сыворотку крови исследовали в цельном виде. Агглютинация наступила сразу после смешивания с сывороткой. Результаты учитывали после выдерживания смеси от 1-2 до 4-5 мин (рис. 4).



Рис. 4. Реакция агглютинация с просветлением жидкости

При положительной реакции в течение 5 мин в капле образуется агглютинат, в случае отрицательной реакции суспензия остаются гомогенной. При микроскопическом исследовании биоматериала, окрашенного по Циль-Нильсену, от 30 зараженных морских свинок микобактерии были обнаружены в 10 случаях у животных, зараженных *M. bovis* и *M. avium*. Контролем служил метод окраски мазков-отпечатков по Циль-Нильсену и бактериологический посев на плотные питательные среды. Результаты приведены ниже в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты исследования проб биоматериала на туберкулез

№ групп и виды микобактерий	Номера морских свинок	Методы исследований				
		микро- скопия	бактерио- логия	ПЦР	ИФА	ККРА
1 группа <i>M. bovis</i> -8	1	+	+	+	+	+
	2	+	рост на 30 сут	+	+	+
	3	+		+	+	+
2 группа <i>M. tuberculosis</i>	4	+	+	+	-	+
	5	+	рост на 30 сут	+	-	+
	6	+		+	-	+
3 группа <i>M. avium</i>	7	+	+	+	-	+
	8	+	рост на 17 сут	+	-	+
	9	+		+	-	+
4 группа <i>M. scrofulaceum</i>	10	+	+	-	-	-
	11	+	рост на 14 сут	-	-	-
	12	+		-	-	-
5 группа <i>M. kansasii</i>	13	+	+	-	-	-
	14	+	рост на 21 сут	-	-	-
	15	+		-	-	-
6 группа <i>M. phley</i>	16	+	+	-	-	-
	17	+	рост на 10 сут	-	-	-
	18	+		-	-	-

Результаты проведенных исследований показали, что в качестве экспресс-методов диагностики туберкулеза крупного рогатого скота можно использовать ИФА, ПЦР-анализ и ККРА с применением разработанного нами антигена.

Испытания эффективности ККРА при диагностике туберкулеза животных в производственных условиях

Диагностика туберкулеза верблюдов является важнейшей составной частью комплекса противотуберкулезных мероприятий в хозяйствах. Главным на сегодняшний день прижизненным методом первичной диагностики остается аллергическое исследование верблюдов путем введения животным туберкулина. Внутрикожная туберкулиновая проба (ВТП) - высокоспецифическая реакция на туберкулез. Однако она зависит от общей иммунореактивности организма. У животных низкой упитанности, старых, глубо костельных, а также при генерализованном туберкулезном процессе реакция на туберкулин может быть слабо выражена или не проявиться (анергия). Следует также учитывать, что иногда возможны неспецифические реакции на туберкулин для млекопитающих, обусловленные сенсibilизацией организма атипичными микобактериями, а также другими причинами. В связи с этим с целью выяснения эпизоотической ситуации по туберкулезу верблюдов было исследовано 540 голов в 5 хозяйствующих субъектах Отырарского района (Арысь – 57, Ш. Калдаякова – 280, Сырдария – 134, Караконыр - 11, Бесторангыл – 58).

В результате выявлено 5 (0,1 %) реагирующих животных на ВТП с применением ППД-туберкулина для млекопитающих. Размеры внутрикожных туберкулиновых реакций колебались от 3 до 5 мм.

Также были исследованы 1912 голов верблюдов в 8 хозяйствующих субъектах Шардаринского района (Турысбеков – 39, Коксу – 176, Коссейт – 117, Узын-Ата – 36, Казахстан – 452, Достык – 618, Акшенгельды – 202,

г. Шардара – 272). При этом в Коксуском сельском округе реагировало 2 головы, в Казахстанском сельском округе реагировало 5 верблюдов. В результате чего было выявлено 7 (0,8 %) реагирующих на туберкулин животных, размеры внутрикожных туберкулиновых реакций колебались от 3 до 5 мм.

У всех реагировавших верблюдов отбирали парные пробы крови: в Vacutainer с ЭДТА (K₂) для постановки кровокapельной реакции агглютинации (ККРА) и с разделительным гелем и активатором свертывания крови – для серологических исследований. В дальнейшем пробы цельной крови были подвергнуты тестированию с помощью ККРА (табл. 3).

В результате применение ККРА позволило установить диагноз на туберкулез в 12 из 2452 исследованных проб (срок от 2 до 5 мин). Для контроля пробы сыворотки крови животных в районной лаборатории были тестированы с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и в результате диагноз на туберкулез также был подтвержден.

Далее в хозяйствующих субъектах Отырарского района Южно-Казахстанской области при аллергическом исследовании ВТП, 604 головы крупного рогатого скота было выделено 18 (0,7 %) коров, реагирующих на

туберкулин (с размерами реакций от 3 до 13 мм). После их изоляции был применена экспресс-диагностика ККРА в сравнении ВТП и ИФА.

Таблица 3 - Результаты ККРА в сравнении ВТП и ИФА

Хозяйствующие субъекты	Вид животных	Исследовано ВТП с применением ППД-туберкулина	Выявлено по ВТП	Выявлено по ККРА	Выявлено по ИФА
Отырарский район					
Арыс	верблюды	57	1	1	1
Ш. Калдаяков	верблюды	280	–	–	–
Сырдария	верблюды	134	2	2	2
Караконур	верблюды	11	2	2	2
Бесторангыл	верблюды	58			
Шардаринский район					
Турысбеков	верблюды	39			
Коксу	верблюды	176	2	2	2
Коссейт	верблюды	117	–	–	–
Узын-ата	верблюды	36	–	–	–
Казахстан	верблюды	452	5	5	5
Достык	верблюды	618	–	–	–
Акшенгельды	верблюды	202	–	–	–
Шардара	верблюды	272	–	–	–
Всего		2452	12	12	12

Реакцию ККРА ставили на предметном стекле путем смешивания капли крови с каплей антигена. После тщательного смешивания антигена с сывороткой крови стекло покачивали круговыми движениями. После выдерживания смеси в течение 1-5 мин агглютинация наблюдалось в 18 пробах (табл. 4).

Таблица 4 - Результаты ККРА в сравнении ВТП и ИФА

Хозяйствующие субъекты	Вид животных	Исслед-но ВТП	Выявлено по ВТП	Выявлено по ККРА	Выявлено по ИФА
Каныбек	КРС	42	1	1	1
ТОО Омар-Ата	КРС	48	3	3	3
Шаман-келсе	КРС	43	1	1	1
Бораш	КРС	41	1	1	1
Бектурсын	КРС	60	1	1	1
ТОО БауКен 777	КРС	53	2	2	2
ТОО Сункар-Тулпар	КРС	35	3	3	3
ТОО Куатбек	КРС	52	4	4	4
ТОО Нурдаулет 2004	КРС	112	1	1	1
ТОО Нурдаулет 2004	КРС	118	1	1	1
Всего		604	18	18	18

В результате проведенных исследований с применением ККРА диагноз на туберкулез был установлен в 18 случаях в срок от 3 до 5 мин. Совпадение результатов диагностики с применением ККРА по отношению к ВТП и ИФА составило 100 %. При этом скорость получения результатов экспресс-диагностики ККРА оказалась гораздо выше.

Кроме того, метод ККРА прошел производственные испытания в хозяйствах ЮКО – на 47 головах с участием сотрудников областных филиалов РГКП «Республиканская ветеринарная лаборатория» и 28 головах крупного рогатого скота с участием сотрудников районных филиалов РГКП «Республиканская ветеринарная лаборатория» (о чем составлены соответствующие акты внедрения, Приложения 1-2).

Совместно с сотрудниками лабораторий Отрарского района Южно-Казахстанского областного филиала РГП и ПВХ «Республиканская ветеринарная лаборатория МСХ РК была проведена сравнительная оценка эффективности разработки по диагностике туберкулеза животных кровокapельной реакцией агглютинации (ККРА), и традиционных методов диагностики туберкулеза – культурального и микроскопического исследования при диагностике туберкулеза сельскохозяйственных животных.

Всего с применением данных методов было исследовано 47 проб биологического материала от животных, реагирующих ВТП с применением ППД-туберкулин для мелкопитающих, из хозяйств ТОО «Касанай», ТОО «Нурдаулет», Крестьянское хозяйство «Кара-ой» Маякумского сельского округа Отрарского района Южно-Казахстанской области. Данные приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты исследования биологического материала с применением ККРА и традиционных методов диагностики туберкулеза

№ проб	Вид исследования и срок получения результата (сут)		
	микроскопия	ККРА	культуральное исследование
1	+	M. bovis (5 мин)	M. bovis (28 сут)
3	-	M. bovis (5 мин)	M. bovis (29 сут)
4	+	M. bovis (5 мин)	M. bovis (28 сут)
11	+	M. bovis (5 мин)	M. bovis (30 сут)
27	-	M. bovis (5 мин)	-
28	+	M. bovis (5 мин)	M. bovis (30 сут)
Всего:	4	6	5

Как следует из данных таблицы 6, совпадение результатов диагностики с применением ККРА по отношению к культуральному методу составило 96,15 % (5 результатов против 6). При этом скорость получения результатов диагностики оказалась гораздо выше. Микроскопия же в 22 случаях не дала результатов – вероятно, вследствие недостаточной концентрации микобактерий в исследуемых образцах. Из приведенных данных можно заключить, что достоверность результатов исследования методом ККРА оказалась достаточно

высокой благодаря более полному выявлению больных животных и бактерионосителей по сравнению с традиционными методами и исключению неоправданного убоя животных со специфическими и неспецифическими реакциями на туберкулин.

Совместно с сотрудниками Южно-Казахстанского областного филиала РГП на ПВХ «Республиканская ветеринарная лаборатория» КВКиН МСХ РК при применении ККРА при диагностике туберкулеза и микобактериозов сельскохозяйственных животных было исследовано 28 проб биоматериала от реагирующих на туберкулин животных из хозяйств Отрарского района Южно-Казахстанской области.

Одновременно было проведено сравнение его эффективности с традиционными методами – бактериологическим посевом и микроскопией мазков из патологического материала (табл. 6).

Таблица 6 – Результаты исследования биологического материала с применением ККРА и традиционных методов диагностики туберкулеза

№ проб	Вид исследования и срок получения результата (сут)		
	микроскопия	ККРА	культуральное исследование
2	+	M. bovis (5 мин)	M. bovis (28 сут)
5	-	M. bovis (5 мин)	M. bovis (30 сут)
6	-	M. bovis (5 мин)	M. bovis (28 сут)
7	+	M. bovis (5 мин)	M. bovis (30 сут)
9	-	M. bovis (5 мин)	M. bovis (29 сут)
10	-	M. bovis (5 мин)	M. bovis (31 сут)
12	+	M. bovis (5 мин)	M. bovis (28 сут)
13	+	M. bovis (5 мин)	M. bovis (30 сут)
16	+	M. bovis (5 мин)	M. bovis (29 сут)
19	-	M. bovis (5 мин)	M. bovis (30 сут)
20	-	M. bovis (5 мин)	M. bovis (29 сут)
23	+	M. bovis (5 мин)	M. bovis (28 сут)
24	+	M. bovis (5 мин)	M. bovis (31 сут)
26	-	M. bovis (5 мин)	M. bovis (30 сут)
27	-	M. bovis (5 мин)	M. bovis (29 сут)
28	-	M. bovis (5 мин)	M. bovis (29 сут)
ИТОГО:	7	16	16

В результате применение ККРА позволило установить диагноз на туберкулез в 16 пробах из 28 исследованных (срок от 2 до 5 мин). Культуральным методом исследования диагноз был подтвержден также в 16 пробах, однако первичный рост культур микобактерий туберкулеза на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена был обнаружен лишь на 28-е сутки. При микроскопическом исследовании микобактерии были обнаружены в 7 пробах.

Результаты диагностики в ККРА и культуральном методе совпали в 100 % проб (по 16 результатов). При этом скорость получения результатов

диагностики при использовании ККРА оказалась значительно выше (в течение 5 мин). При использовании микроскопии исследование 7 проб результатов не дало.

Использование метода кровосекательной реакции агглютинации позволило сократить сроки исследований, повысить эффективность диагностики туберкулезной инфекции, обеспечить более достоверную постановку диагноза, выявляя больных животных и бактерионосителей, исключать неоправданный убой животных с неспецифическими реакциями на аллерген, что особенно ценно в современных условиях ведения хозяйства (табл. 7).

Таблица 7 - Сводная таблица применения ККРА в областной и районной ветеринарных лабораториях

Хозяйствующие субъекты	Вид животных и место проведения исследования		ВТП	Выявлено ВТП	Выявлено ККРА	Выявлено ИФА
ТОО Касанай	КРС	обл. вет. лаб	28	16	16	16
ТОО Нурдаулет	КРС	обл. вет. лаб	28	16	16	16
Кара-ой	КРС	обл. вет. лаб	28	16	16	16
Усенов	верб	рай. вет. лаб	52	4	4	4
Сыздыкбаев А.	КРС	рай. вет. лаб	63	1	1	1
Всего:			199	53	53	53

Всего совместно с сотрудниками областной и районной вет. лабораторий исследовано 199 проб биоматериала от реагировавших на туберкулин животных. При этом диагноз на туберкулез подтвердился бактериологическим методом и посредством ККРА в 53 случаях, что составляет 100 %.

Приведенные данные дают нам основание заключить, что достоверность результатов исследования методом ККРА достаточно высока благодаря более полному и, главное, быстрому выявлению больных животных и бактерионосителей по сравнению с традиционными методами и исключению неоправданного убоя животных с неспецифическими реакциями на туберкулин.

Разработка питательной среды для ускоренного культивирования микобактерий

Трудности выделения микобактерий туберкулеза из патологического материала связаны с биологическими особенностями возбудителя – одно вегетативное деление клетки микобактерий происходит за 14–18 часов, а также со снижением жизнеспособности микобактерий в результате применения антибактериальных препаратов при различных методах предпосевной обработки материала. Вследствие этого сроки постановки первичного диагноза на туберкулез бактериологическим методом удлиняются до 3 месяцев.

Перед нами стояла задача по разработке способа культивирования микобактерий туберкулеза и выделение возбудителя из биоматериала животного находящегося как в вегетативной, так и в трансформированной форме.

Диагностическим материалом служили пробы биологического материала, полученных от 25 морских свинок, которые были разбиты на 5 групп и

инфицированы микобактериями для моделирования экспериментального туберкулеза.

Морских свинок I и II группы заражали подкожно вирулентной культурой *M. bovis*-8 и *M. tuberculosis*-H37_{Rv} в дозе 0,001 мг, III группе морских свинок вводили взвесь культуры *M. avium*; IV группе вводили взвесь культуры *M. scrofulaceum*; V группе вводили взвесь культуры *M. phlei* подкожно каждой морской свинке по 1 мг в 1 см³ физиологического раствора.

Через 30 дней были взяты пробы крови из сердца морских свинок в объеме 3-5 см³ с добавлением антикоагулянта (цитрат натрия). Кровь брали с соблюдением правил асептики и антисептики одноразовым шприцом. Затем все животные были убиты. После проведения вскрытия от каждого животного были взяты лимфатические узлы, печень, легкие и почки для проведения микробиологического исследования по общепринятой методике с посевом на на разработанной нами среде Левенштейна-Йенсена и на среду ВКГ для проведения ИФА.

В результате было обнаружено, что наибольшая обсемененность обнаружена в легких, печени, селезенке, наименьшая – в заглочных и бронхиальных лимфоузлах. Микроскопия показала наличие в мазках микобактерий туберкулеза.

Сразу после взятия крови к ней добавляли в равном объеме стимулятор роста, полученную смесь инкубировали в термостате в течение 24 ч при температуре 37-38 °С.

Таблица 8 – Результаты исследования проб биоматериала морских свинок на туберкулез

№ п/п групп и виды микобактерий	Методы исследований						
	обработка по Аликаевой контроль 1	предкультивирование	рост на среде ВКГ контроль 2	микроскопия	РА	ИФА	ПЦР
I группа <i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	+	+	—	+
	+	+	+	+	+	—	+
	+	+	+	+	+	—	+
II группа <i>M. bovis</i> -8	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+
III группа <i>M. avium</i>	+	+	+	+	—	—	—
	+	+	+	+	—	—	—
	+	+	+	+	—	—	—
IV группа <i>M. scrofulaceum</i>	+	+	+	+	—	—	—
	+	+	+	+	—	—	—
	+	+	+	+	—	—	—
V группа <i>M. phley</i>	+	+	+	+	—	—	—
	+	+	+	+	—	—	—
	+	+	+	+	—	—	—

Как видно из таблицы 8, рост культур *M. bovis*-8 и *M. tuberculosis* на среде Левенштейна-Йенсена после обработки биоматериала общепринятым методом был получен в традиционные сроки культивирования микобактерий – на 20-28 сутки, а рост колоний культур *M. avium* наблюдался на 17 сутки, *M. scrofulaceum* – на 14 сутки и *M. phley* – на 4 сутки.

Положительный результат ИФА из биомассы, выросшей на разработанной среде и ВКГ, был получен в 1-й группе морских свинок, зараженных микобактериями бычьего вида, ПЦР – в 1 и 2 группах животных.

Рост колоний культур *M. bovis* и *M. tuberculosis* на среде Левенштейна-Йенсена, сделанных соответственно из выросшей на разработанной среде и ВКГ биомассы был обнаружен на 21 сутки.

На разработанной среде при просмотре пробирок в проходящем свете наблюдали рост мелких беловатых, прозрачных, восковидных колоний культур на 3-5 сутки.

По результатам проведенных исследований установлено, что предварительное культивирование исследуемых проб в среде Школьниковой в модификации Дорожковой при 37 °С в течение 24-48 часов способствует прорастанию измененных форм микобактерий, которые после посева дают видимый рост колоний на 3–5 сутки культивирования. Эти данные подтверждают возможность ускорения роста культур микобактерий и сокращения сроков диагностики туберкулеза бактериологическим методом в три-четыре раза путем предварительного культивирования диагностического материала на опытной среде.

ВЫВОДЫ

1. Метод N. Harboe, A. Ingild для иммунизации кроликов разработанными нами антигенами позволяет получить полноценный иммунный ответ организма в течение 17 дней.
2. Полученные гипериммунные сыворотки при иммунизации кроликов с применением адьюванта Фрейнда обладают достаточно высокой активностью (титр в ИФА – до 1:7680) и специфичностью, что позволяет применять их для диагностики туберкулеза животных.
3. Разработанная нами экспресс-диагностика ККРА достаточно проста в постановке и не требует сложного оборудования и дефицитных реагентов. Предложенный метод позволяет сократить срок исследования до 3–5 мин. Достоверность ККРА сравнима с культуральным исследованием, совпадение результатов составляет в среднем 97,62 %.
4. Использование предлагаемой питательной среды для ускоренного культивирования микобактерий подтверждает возможность сокращения сроков диагностики туберкулеза бактериологическим методом в три-четыре раза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При проведении диагностики туберкулеза животных проводить исследования согласно разработанной рекомендации по диагностике туберкулеза животных кровокapельной реакцией агглютинации (ККРА).
2. Предлагаемая экспресс-диагностика туберкулеза животных методом ККРА может быть использована ветеринарными работниками для проведения диагностики туберкулеза животных непосредственно на ферме, ее применение позволяет сократить сроки постановки диагноза на туберкулез, автоматизировать и унифицировать процесс лабораторного исследования.
3. Использование разработанной питательной среды для ускоренного культивирования микобактерий сокращает сроки постановки диагноза на туберкулез бактериологическим методом в три-четыре раза.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Елекеев, Т. А. Совершенствование методов диагностики туберкулеза крупного рогатого скота [Текст] / Н. С. Сырым, Г. Т. Сарсенова, С. М. Асильов, Т. А. Елекеев // Труды IV Межд. научн. конф. молодых учёных «Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых учёных». - Новосибирск, пос. Краснообск, 2010, 2 часть. - С. 128-131.
2. Рекомендации по диагностике животных кровокapельной реакцией агглютинации (ККРА) [Текст] / К. А. Тургенбаев, Н. С. Сырым, Т. А. Елекеев, Р. З. Нургазиев // Рекомендации. Утверждены на Ученом Совете ТОО «КазНИВИ» АО «КазАгроИнновация» (протокол № 4 от 26.10.2010). – Алматы, 2010. – 11 с.
3. Елекеев, Т. А. Определение эффективности методов диагностики туберкулеза у верблюдов [Текст] / Т. А. Елекеев, С. С. Карабекова, К. А. Тургенбаев // Сб. трудов КазНИВИ. - Т. 55. - 2011.
4. Елекеев, Т. А. Совершенствование методов прижизненной дифференциации от микобактериозов и сапронозов специфических туберкулиновых реакций [Текст] / Р. З. Нургазиев, Т. А. Елекеев, С. Ж. Басыбеков, Н. С. Сырым // Вестник КНАУ им. К.И. Скрябина. - № 1 (23). - 2012. - С. 167-169.
5. Елекеев, Т. А. Результаты сравнительного испытания МПМ и культурального метода при диагностике туберкулеза животных [Текст] / Р. З. Нургазиев, Т. А. Елекеев, К. А. Тургенбаев, Н. С. Сырым // Вестник КНАУ им. К.И. Скрябина. - № 1 (23). - 2012. - С. 170-172.
6. Елекеев, Т. А. Совершенствование методов диагностики туберкулеза животных [Текст] / Р. З. Нургазиев, Т. А. Елекеев, Н. С. Сырым, К. А. Тургенбаев // Вестник сельскохозяйственной науки (КыргНИИВ, КыргНИИЖП). – 2012. - № 6. - С. 259-262.
7. Елекеев, Т. А. Усовершенствование методов приготовления антигена для кровокapельной реакции агглютинации [Текст] / Р. З. Нургазиев, Т. А. Елекеев, Н. С. Сырым, К. А. Тургенбаев // Вестник сельскохозяйственной науки (КыргНИИВ, КыргНИИЖП). – 2012. - № 7. - С. 226-229.

8. Елекеев, Т. А. Стимулирование роста микобактерий [Текст] / К. А. Тургенбаев, Н. С. Сырым, Т. А. Елекеев // Фтизиопульмонология. Национальный центр проблем туберкулеза МЗ РК. - № 2 (21). - 2012. - С. 128-134.
9. Елекеев, Т. А. Сравнительная оценка лабораторных методов диагностики туберкулеза животных [Текст] / Р. З. Нургазиев, Т. А. Елекеев, Н. С. Сырым, Б. А. Еспембетов // Вестник КНАУ им. К.И. Скрябина. - № 1 (37). - 2016. - С. 110-118.
10. Елекеев, Т. А. Сенситины для дифференциации неспецифических реакции у КРС на ППД-туберкулин для млекопитающих [Текст] / М. Базарбаев, Н. С. Сырым, Т. А. Елекеев, Д. Р. Садикова, А. Р. Сансызбай, С. Ж. Басыбеков, Б. А. Еспембетов // Вестник Алтайского государственного университета. – 2016. - № 06 - С. 118-125.
11. Елекеев, Т. А. Ускоренный способ постановки диагноза на туберкулез и дифференциация неспецифических туберкулиновых реакций у животных [Текст] / С. Ж. Басыбеков, Т. А. Елекеев, Б. А. Еспембетов, Н. С. Сырым // Вестник Алтайского государственного университета. – 2016. - № 06. - С. 126-132.

РЕЗЮМЕ

диссертации Елекеева Токсейт Артыкбайулы на тему: «Совершенствование метода диагностики туберкулеза животных» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Ключевые слова: туберкулез, крупный рогатый скот (КРС), диагностика, кровокапельная реакция агглютинации, моноклональные антитела, полимеразно-цепная реакция (ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА), микроскопия, бактериология.

Объект исследования: лабораторные животные (кролики и морские свинки), верблюды, крупный рогатый скот, цельная кровь, сыворотка культуры микобактерий: *M. tuberculosis*, *M. bovis*.

Цель работы: усовершенствование методов диагностики туберкулеза животных и внедрение их в ветеринарную практику.

Методы исследования: в данной работе были использованы экспресс-методы - ПЦР, ИФА и ККРА в сравнении с общепринятыми классическими (бактериологическими) методами диагностики данной инфекции, а также ВТП – с применением ППД-туберкулина для млекопитающих.

Полученные результаты и их новизна:

- разработан способ получения антигена для постановки реакции ККРА;
- полученные с применением метода иммунизации кроликов N. Harboe, A. Ingild с применением адьюванта Фрейнда гипериммунные сыворотки обладают достаточно высокой активностью (титр в ИФА до 1:7680) и специфичностью, что позволяет применять их для диагностики туберкулеза животных;

- для практических ветеринарных лабораторий предложена экспресс-диагностика туберкулеза животных (ККРА);

- разработаны и внедрены рекомендации по диагностике туберкулеза животных кровокapельной реакцией агглютинации (Приложение 1), утвержденные Ученым советом РГП «НПЦЖиВ», протокол № 13 от 20.11.2010) и Ученым Советом ДГП «НИВИ», протокол № 4 от 26.11.2010.

Для практических ветеринарных работников районных и областных лабораторий предложена экспресс-диагностика туберкулеза животных. Применение экспресс-диагностики позволяет сократить сроки постановки диагноза на туберкулез до 3-5 мин, автоматизировать и унифицировать процесс исследования. Предлагаемая экспресс-диагностика туберкулеза животных, предназначена для ветеринарных работников для проведения диагностики туберкулеза животных непосредственно на ферме.

Разработанная нами экспресс-диагностика ККРА достаточно проста в постановке и не требует сложного оборудования и дефицитных реагентов. Это даст возможность производить диагностику туберкулеза, избегая неоправданного убоя реагирующих на туберкулин животных, не являющихся больными туберкулезом, либо бактерионосителями. Достоверность ККРА сравнима с культуральным исследованием, совпадение результатов составляет в среднем 97,62%.

Использование разработанной питательной среды для ускоренного культивирования микобактерий подтверждают возможность сокращения сроков диагностики туберкулеза бактериологическим методом в три-четыре раза.

Область применения: эпизоотология, бактериология и ветеринарная практика.

REZUME

Yelekeyev Tokseiit Artukbayuly dissertation on the theme: "Improving TB diagnostic method of animals" for the degree of candidate of veterinary sciences on a specialty 06.02.02 - veterinary microbiology, virology, epizootiology, mycology with mikotoksikology and immunology

Keywords: tuberculosis, cattle, diagnostics, blood drip agglutination test, monoclonal antibodies, polymerase chain reaction (PCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), microscopy, bacteriology.

Object of research: laboratory animals (rabbits and guinea pigs), camel, cattle, whole blood, serum culture of mycobacteria: M. tuberculosis, M. bovis.

The work purpose: improvement of method of diagnosis of animals' tuberculosis and their introduction in veterinary practice.

Methods: in this study were used rapid methods - PCR (polymerase chain reaction), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and blood drip agglutination test in comparison with the conventional classical (bacteriological) methods of diagnostics of the infection as well as the intradermal tuberculin test - using purified protein derivative (PPD) tuberculin for mammals.

The results and their novelty:

- a method of producing an antigen for raising blood drip agglutination test;
- obtained hyperimmune serum using the method of immunizing rabbits by N. Harboe, A. Ingild with Freund's adjuvant have sufficiently high activity (titer in ELISA - 1:7680) and the specificity that makes them suitable for the diagnosis of animals' tuberculosis;
- for practical veterinary laboratories offered express-diagnosis of animal tuberculosis (blood drip agglutination test);
- developed and implemented a recommendation for the diagnosis of animal tuberculosis by blood drip agglutination test (Appendix 1), approved by the Academic Council of DSE "SRVI", protocol № 4, 26.11.2010, and the Academic Council of RSE "SICLV", protocol № 13, 20.11.2010).

For practical veterinary workers, district and regional laboratories offered rapid diagnosis of animal tuberculosis. The use of rapid diagnosis allows reducing the time of diagnosis of tuberculosis up to 3-5 minutes, to automate and standardize the process of investigation. The proposed express-diagnosis of animal tuberculosis veterinary workers intended to diagnose tuberculosis animals directly on the farm. Developed rapid diagnosis of blood drip agglutination test is simple enough and does not require sophisticated equipment and scarce reagents. This will enable to diagnose TB, avoiding unnecessary slaughter of animals reacting to tuberculin which are not suffering from tuberculosis or bacteria carriers. Credibility to the edge is comparable to the study of the culture; the coincidence of the results is an average 97.62%.

Using the developed culture medium for the rapid cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* confirmed the possibility of reducing the time of diagnosis by bacteriological method in three or four times.

Scope: epizootology, bacteriology and veterinary practice.