

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ)
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



ВАЛЕЕВА АННА РАФКАТОВНА

**ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ
СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
ТУБЕРКУЛЕЗЕ**

06.02.05 – ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, доцент,

Мукминов Малик Нилович;

кандидат ветеринарных наук,

Шуралев Эдуард Аркадьевич

Казань – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ		Стр.
	ВВЕДЕНИЕ	4
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
	1.1 Кадмий – приоритетный экотоксикант: содержание в окружающей среде, источники загрязнения и влияние на состояние здоровья животных	10
	1.2 Этиология, патогенез и диагностика туберкулеза	21
	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2	Материалы и методы	35
3	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	44
	3.1 Показатели естественной резистентности организма кроликов, инфицированных <i>Micobacterium bovis</i> на фоне хронической интоксикации хлоридом кадмия	44
	3.1.1 Физиологические показатели	44
	3.1.2 Биохимические показатели	48
	3.1.3 Гематологические показатели	57
	3.2 Специфический иммунный ответ кроликов при экспериментальном инфицировании <i>Micobacterium bovis</i> и влияние хлорида кадмия на антителогенез	63
	3.2.1 Оптимизация непрямого иммуноферментного анализа для оценки гуморального иммунного ответа	63
	3.2.2 Оценка специфического иммунитета при патогенезе туберкулеза на фоне интоксикации хлоридом кадмия	70
	3.3 Постмортальные исследования внутренних органов и тканей кроликов, инфицированных <i>Micobacterium bovis</i> на фоне хронической интоксикации кадмием	75
	3.3.1 Патоморфологические и гистологические исследования	75
	3.3.2 Бактериологические исследования и молекулярно-генетический анализ	88

3.3.3 Остаточное содержание кадмия в органах и тканях	95
3.4 Ветеринарно-санитарная экспертиза продуктов убоя кроликов, инфицированных <i>Micobacterium bovis</i> на фоне хронической интоксикации хлоридом кадмия	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	105
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	107
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	136
ПРИЛОЖЕНИЯ	140

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности. Для современного мира характерно увеличение зон с высокой антропогенной нагрузкой. Урбанизация, рост потребностей населения, развития промышленности и сельского хозяйства приводят к экологическому дисбалансу среды обитания. Одним из основных поллютантов являются тяжелые металлы (Смирнов А.М., Дорожкин В.И., Рубченко П.Н., 2010; Конюхова В.А., Папуниди К.Х., Кузина М.В., Тремасов М.Я., 2012; Дорожкин В.И., Кроль М.Ю., 2014), который влияет на состояние здоровья человека (Кряжев Д.А., Боев М.В., Тулина Л.М., 2015) и животных (Донник И.М., Шкуратова И.А., 2011). Они обладают кумулятивными свойствами и при длительном поступлении даже в небольших дозах способны накапливаться и влиять на метаболические процессы, оказывать иммуносупрессивное действие в отношении иммуноглобулинов классов IgA и IgE, митоген-индуцированной стимуляции пролиферации иммунцитов (Застенская И.А., Пивень Н.П., Кочубинский В.В., Кочубинский А.В., 2014). При этом прослеживается корреляционная зависимость депонирования тяжелых металлов в организме животных от близости расположения кормовых угодий к промышленным предприятиям и автомагистралям (Степанова Е.В., Слюзова О.В., Бучарская А.Б., Киреев Р.А., Игнатов В.В., 2008; Шкуратова И.А., Донник И.М., Исаева А.Г., Кривоногова А.С., 2015). Высокий уровень содержания тяжелых металлов в кормах и в большей степени в сене и силосе (Лоретц О.Г., Барашкин М.И., 2012) обусловлен их большей аккумуляцией в вегетативных органах растений (Еськов Е.К., Еськова М.Д., Серая Л.В., 2012).

Приоритетным экотоксикантом окружающей среды и вторым по санитарно-токсикологической опасности является кадмий (Смирнов А.М., Дорожкин В.И., Рубченко П.Н., 2010). Соединения кадмия в окружающую среду выделяются при добыче и переработке нефти, выплавке металлов, при

использовании органических и минеральных удобрений (Лукин С.В., Четверикова Н.С., 2013), фунгицидных препаратов в агропромышленном комплексе, при выхлопе автомобилей. На загрязненных территориях кадмий аккумулируется растениями и по пищевым цепям попадает в организм животных (Шкуратова И.А., Донник И.М., Исаева А.Г., Кривоногова А.С., 2015). Значительная часть ксенобиотика накапливается в мышечной ткани животных (Смирнов А.М., Дорожкин В.И., Рубченко П.Н., 2010). Однако больше всего металл аккумулируется в почках и печени (Донник И.М., Шкуратова И.А., Хасина Э.И., Якубенко Е.В., 2012; Кадиков И.Р., 2015). Депонированный в органах и тканях животных металл вызывает цитолиз клеточных структур, запускает некротические и дистрофические процессы (Гутникова А.Р., Мавлян-Ходжаев Р.Ш., Ашурова Д.Д., Саидханов Б.А., Махмудов К.О., Косникова И.В., 2011; Кривоногова А.С., Исаева А.Г., Баранова А.А., 2013), сопровождающиеся активацией синтеза металлотионов, увеличением концентрации малонового альдегида (Мирзоев Э.Б., Кобялко В.О., Губина О.А., Фролова Н.А., 2014). Ионы кадмия ингибируют активность антиоксидантной системы, приводят к образованию свободных радикалов и усилению процессов перекисного окисления липидов (Степанова Е.В., Слюзова О.В., Бучарская А.Б., Киреев Р.А., Игнатов В.В., 2008). Токсическое поражение внутренних органов оказывает влияние на показатели естественной резистентности, гемопоэза, клеточного и гуморального иммунитета (Ткаченко Е.А., Дерхо М.А., 2015). Введение с рационом кадмия приводит к снижению Т- и В-лимфоцитов (Жоров Г.А., Рубченков П.Н., Обрывин В.Н., 2011).

Высокая заболеваемость туберкулезом среди людей и сельскохозяйственных животных обусловлена особенностью строения и химического состава клеточной стенки микобактерий, способностью к L-трансформации возможностью перекрестного заражения и сохранять жизнеспособность под действием внешних неблагоприятных факторов (Смирнов А.М., 2004). Эпидемиологическими исследованиями высокие концентрации

кадмия обнаружены в образцах волос от больных туберкулезом людей (Mehra R., Juneja M., 2005) и в волосах, крови и моче пациентов с синдромом иммунодефицита человека (AIDS) (Afridi H.I., Kazi T.G., Kazi N., Kazi T.G., Kazi N., Kandhro G.A., Shah A.Q., Baig J.A., Khan S., Kolachi N.F., Wadhwa S.K., Shah F., 2011). При этом отмечается, что высокие уровни кадмия могут быть прогностическими факторами туберкулеза и других вторичных инфекций у больных с вирусом иммунодефицита человека (HIV) (Afridi H.I., Kazi T.G., Kazi N., Kazi T.G., Kazi N., Kandhro G.A., Shah A.Q., Baig J.A., Khan S., Kolachi N.F., Wadhwa S.K., Shah F., 2011).

На фоне кадмиевой интоксикации усиливается вирулентность бактерий рода *Micobacterium* и усугубляет течение инфекционного процесса (Bozelka V.E., Burkholder P.M., 1979; Застенская И.А., Лысенко А.П., Кочубинский В.В., Кочубинский А.В., 2014).

В связи с выше изложенным изучение влияния кадмия на патогенез туберкулеза является актуальным и в теоретическом и в прикладном аспекте.

Целью исследования являлась комплексная оценка влияния хронической кадмиевой интоксикации на показатели естественной резистентности и специфического иммунитета кроликов при инфицировании *Micobacterium bovis*.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить динамику изменения показателей естественной резистентности;
2. Получить и оценить диагностическую значимость антигенов из экстракта клеток и вторичных метаболитов микобактерий *M.bovis*;
3. Оптимизировать метод непрямого иммуноферментного анализа на основе полученных антигенов для оценки гуморального иммунного ответа;
4. Изучить влияние кадмия на антителообразование в динамике патогенеза туберкулеза;
5. Провести послеубойную ветеринарно-санитарную экспертизу органов экспериментальных животных на предмет содержания кадмия и *M.bovis*.

Научная новизна. Впервые изучено влияние хронической кадмиевой интоксикации на показатели состояния здоровья животных при патогенезе туберкулеза. Определена диагностическая значимость полученных антигенов из экстракта клеток и вторичных метаболитов *M.bovis*. Оптимизированы условия и режимы постановки непрямого иммуноферментного анализа с использованием полученного антигенного материала. Показано негативное влияние хронической кадмиевой интоксикации на специфический иммунный ответ при туберкулезе.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании проведенных исследований установлено усугубление противотуберкулезного иммунитета под влиянием хронической интоксикации кадмием, выражающееся в замедление роста и развития, нарушении белкового обмена и изменении активности сывороточных ферментов, сдвига лейкоцитарной формулы, подавление выработки Т-лимфоцитов, угнетение функциональной активности В-лимфоцитов и антителогенеза. Усовершенствован метод непрямого иммуноферментного анализа для оценки специфического гуморального иммунитета. Научно обоснована эффективность мультиантигенного подхода в серодиагностике туберкулеза.

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе Института экологии и природопользования ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» при чтении курсов: «Экологическая эпидемиология» для подготовки бакалавров по направлению подготовки 05.03.06 «Экология и природопользование»; и «Основы биологической безопасности» для подготовки магистров по направлению подготовки 05.04.06 «Экология и природопользование». Разработаны «Технологический регламент получения антигена из клеточной стенки *Micobacterium bovis* Bovinus-8» (утвержден заместителем директора по НИР ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 07.07.2016), «Способ получения гипериммунной сыворотки к микобактериальным антигенам. Методические рекомендации» (одобрены научно-методическим советом ФГБНУ

«ФЦТРБ-ВНИВИ», протокол №4 от 29.12.2016; утверждены директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 29.12.2016).

Методы исследования. В исследование использовали модельных животных – кроликов, штаммы *Micobacterium bovis* Bovinus-8 и *Micobacterium tuberculosis* H37Rv. В рамках эксперимента применяли следующие методы: клинические, клинико-биохимические, гематологические, иммунологические и иммунохимические, патоморфологические, гистологические, микробиологические, молекулярно-генетические, токсикологические и методы математической статистики.

Положения, выносимые на защиту.

1. Влияние хронической кадмиевой интоксикации на показатели состояния здоровья животных при патогенезе туберкулеза.
2. Обоснование мультиантигенного подхода в серодиагностике туберкулеза.
3. Динамика специфического иммунного ответа при туберкулезе на фоне хронической кадмиевой интоксикации.
4. Патогенез и морфофункциональные изменения внутренних органов и тканей при туберкулезе на фоне хронической кадмиевой интоксикации.

Степень достоверности результатов. Научные результаты получены на основе экспериментальных материалов достаточных для получения статистически достоверных данных с использованием современных методов исследований. Экспериментально полученные числовые данные подвергались математической обработке методом вариационной статистики с применением пакета прикладных программ Microsoft Excel и STATISTICA.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на ежегодных итоговых научных конференциях ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (2012, 2013, 2015, 2016 г.); III Междунар. науч. Интернет-конф. «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий» (Казань, 2012); IV Междунар. Казанском инновационном

нанотехнологическом форуме (NANOTECH'2012) (Казань, 2012); II Всероссийской науч. конф. с междунар. участ. «Окружающая среда и устойчивое развитие регионов» (Казань, 2013); IV Междунар. науч.-практ. конф. «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (Казань, 2014); Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием «Актуальные направления инновационного развития животноводства и ветеринарной медицины» (Уфа, 2014); Междунар. науч.-практ. конф. «Инновационные подходы к решению современных проблем ветеринарной медицины» (Екатеринбург, 2015); V Междунар. науч.-практ. конф. «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (Казань, 2015); Междунар. науч. конф. «Современные проблемы ветеринарной и аграрной науки и образования» (Казань, 2016).

Публикации. Основное содержание диссертационной работы представлено в 17 публикациях, включая 5 статей в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, 12 материалах, представленных на всероссийских и международных конференциях.

Структура и объём диссертации. Диссертация имеет объем 158 страниц и содержит введение, три главы, заключение, списки сокращений, библиографический и иллюстративного материала, приложения. Диссертационная работа иллюстрирована 18 рисунками и 16 таблицами. Библиографический список содержит 208 литературных ссылок, в том числе 53 на иностранных языках.

Автор работы благодарит за консультативную и методическую помощь при проведении некоторых этапов исследования сотрудников ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (с.н.с. Ахмадеева Р.М., с.н.с. Конюхову В.А., в.н.с. Хаммадова Н.И.), заведующего ЦНИЛ Казанской государственной медицинской академии – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России Хаертынова К.С.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Кадмий – приоритетный экотоксикант: содержание в окружающей среде, источники загрязнения и влияние на состояние здоровья животных

Состояние здоровья животных и человека, являющихся частью глобальной природной системы, напрямую связано с балансом элементов биосферы. Техногенное загрязнение среды обитания приводит к распространению заболеваний, обусловленных экологическими проблемами и техногенным загрязнением, развитию микроэлементозов, в том числе отравлению тяжелыми металлами и другими токсичными веществами. По данным Кряжева Д.А., Боева М.В. и Туллиной Л.М. (2015) содержащиеся в воздухе и воде химические вещества обладают высокими коэффициентами опасности и суммарного неканцерогенного риска для органов дыхания, кровеносной и иммунной систем, желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы. Для решения этой проблемы необходимо комплексное изучение действия экотоксиканта на показатели здоровья и резистентность организма (Норматова Ш.А., Ашурова М.Д., Эрматова Г.А., Хожиматов Х.О., Султонов Г.Н., Болтабоев У.А., 2014; Харитонов В.И., 2015).

Большое значение имеют факторы загрязнения экотоксикантами, угнетающими иммунную систему организма, такими как тяжелые металлы (Новиков В.А., Тремасов М.Я., 2004). Наиболее опасными из них для живых существ считаются кадмий, марганец, медь, мышьяк, ртуть и свинец (Бреус И.П., Садриева Г.Р., 1997; Ильязов Р.Г., 2006; Кадиков И.Р., 2015; Онищенко Г.Г. 2014).

На территориях с высокой антропогенной нагрузкой миграция тяжелых металлов проходит в системе почва – корма – организм животных – человек (Смирнов А.М., Дорожкин В.И., Рубченко П.Н., 2010; Еськов Е.К., Еськова М.Д.,

Серая Л.В., 2012; Донник И.М., Шкуратова И.А., Хасина Э.И., Якубенко Е.В., 2012). Установлены тенденции к росту содержания ТМ в растениях при увеличении их количества в почве (Валеева Г.Р., Латыпова В.З., Винокурова Р.И., Иванова Е.Р., 2012). Шкуратова И.А. с соавторами (2015) указывает на зависимость депонирования экотоксикантов от близости расположения кормовых угодий к промышленным предприятиям и автомагистралям, выражающееся в 5-10 кратном превышении ПДК Zn, Pb, Cu, Cd и др. металлов в органах и тканях крупного рогатого скота.

При исследовании дозового риска тяжёлых металлов, содержащихся в продуктах питания Казимовым А.К. и Алиевой Н.В. (2014) выявлен риск для здоровья организма человека, величина дозового риска от 0,15 до 3,77, уровень металлов в рационе коррелировал с их содержанием в волосах и крови. ТМ в повышенных концентрациях влияет на показатели здоровья, белковый и липидный обмен, неспецифического иммунитета и молочную продуктивность сельскохозяйственных животных (Ахметзянова Ф.К., Ильязов Г.Г., Зарипова Л.П., Зайсанов Р.Р., 2005; Донник И.М., Шкуратова И.А., Кривоногова А.С., Исаева А.Г., Андрейко А.А., Хасина Э.И., 2010; Гутникова А.Р., Мавлян-Ходжаев Р.Ш., Ашурова Д.Д., Саидханов Б.А., Махмудов К.О., Косникова И.В., 2011; Лоретц О.Г., Барашкин М.И., 2012). У крупного рогатого скота, выращенного на загрязнённых территориях, отмечают увеличение объема почек и печени с изменением их морфологии и гистологических структур (Ежкова А.М., Яппаров А.Х., Ежкова М.С., 2011).

Одним из приоритетных поллютантов окружающей среды и вторым по санитарно-токсикологической опасности является кадмий (Смирнов А.М., Дорожкин В.И., Рубченко П.Н., 2010). По данным Фокина В.А. и Атисковой Н.Г. (2015) существует достоверная связь между количеством кадмия в продуктах питания и заболеваниями, связанными с нарушениями эндокринной системы, обменных процессов, иммунной системы и других негативных последствий для

здоровья. Авторы предлагают установить суточную дозу Cd, поступающего с пищей до 0,00055 мг/кг в сутки.

Кадмий в природной среде в свободном виде не встречается и в земной коре концентрация металла примерно 0,05 мг/кг, а в морской воде содержится около 0,3 мкг/л (Никифорова Т.Е., 2009). Данный металл имеет широкий спектр источников антропогенного поступления в окружающую среду. Так при добыче и переработке нефти соединения кадмия попадают в почву и подземные источники пресной воды. Тукмакова Р.М. с соавторами (2006) отмечает частую встречаемость проб воды с концентрацией Cd выше ПДК на территории Закамья РТ. Однако показатели содержания ТМ в почве районов нефтедобычи РТ по данным Конюховой В.А., Папуниди К.Х., Кузиной М.В., Тремасова М.Я. (2012) не превышали ПДК.

Лукин С.В. и Четверикова Н.С. (2013) считают основным путем поступления экотоксиканта в агроэкосистемы с органическими и минеральными удобрениями (0,256 г/га). Кроме того, количество Cd в почве увеличивается при применении удобрений из осадка хозяйственно-бытовых сточных вод (Смирнов А.М., Дорожкин В.И., Рубченков П.Н., 2010). При этом количество металла достоверно уменьшается при увеличении глубины, а в пахотном слое уровень подвижных форм достигает 0,054 мг/кг (Четверикова Н.С., Марциневская Л.В., 2013).

Еськов Е.К., Еськова М.Д., Серая Л.В. (2012) указывают на то, что выращивание агрокультур вблизи автомагистралей приводит к аккумуляции Cd, при этом в вегетативных органах растений содержание металла в 1,2-1,5 раза больше чем корнях. Кроме того, отмечена корреляция его содержания в органах и тканях растений от расстояния до автомобильных дорог (Еськов Е.К., Еськова М.Д., 2013). На расстоянии от источника загрязнения 10 км содержание металла в сельскохозяйственных культурах достигало 21,6 мг/кг, а 60 км – 4 мг/кг (Смирнов А.М., Дорожкин В.И., Рубченков П.Н., 2010). А количество поглощаемого Cd

зависит от вида и состояния растительного организма (Минеев В.Г., Лебедева Л.А., Арзамазова А.В., 2009; Stritsis C., Steingrobe B., Classen N., 2014).

В организме животных накопление Cd происходит при их поступление с пищей, водой и с вдыхаемым воздухом (Ахметзянова Ф.К., Ильязов Г.Г., Зарипова Л.П., Зайсанов Р.Р., 2005; Гутникова А.Р., Мавлян-Ходжаев Р.Ш., Ашурова Д.Д., Саидханов Б.А., Махмудов К.О., Косникова И.В., 2011; Стребкова З.В., Онистратенко Н.В., Пенькова И.Н., 2011). Для человека одним из источников поступления металла является курение, в крови курильщиков концентрация Cd достоверно выше (Агбальян Е.В., Шинкарук Е.В., 2015). При этом срок полувыведения ксенобиотика из организма превышает 10 лет и составляет 0,1 % в сутки (Эйхлер В.Д., 1985).

Существует множество научных работ доказывающих, что больше всего металла накапливается в паренхиматозных органах, почках и печени (Larpenbusch W.L., Gile J.D., 1975; Садовников Н.В., Фесенко Е.А., Кольберг Н.А., Байматов В.Н., 2011). Кроме того, на разновозрастных группах зайца-русака доказана статистически значимая зависимость аккумулятивной способности Cd в паренхиматозных органах от возраста животных (Petrovic Z., Teodorović V., Djurić S., Milićević D., Vranić D., Lukić M., 2014).

В районах с высокой антропогенной нагрузкой у крупного рогатого скота содержание Cd в печени варьировало в пределах 3,37-3,42 мкг/кг, что в 10 раз превышает ПДК (Донник И.М., Шкуратова И.А., Хасина Э.И., Якубенко Е.В., 2012). При экспериментальной затравке овец хлоридом кадмия из расчета 1/10 ЛД₅₀ металл аккумулировался в почках и печени, достигая значений к 40 сут исследования 2,2 и 1,1 мг/кг соответственно (Софронов П.В., 2009). Конюхова В.А. (2001) в своей работе указывает на депонирование Cd в почках и печени в количествах, превышающих показатели фона 4-11 раз. Содержание металла в органах перепелов при введении в рацион 2 мг/кг ионов Cd к 60 сут достигало уровня выше показателя контрольной группы в печени в 9 и в почках - 28 раз (Лисунова Л.И., Токарев В.С., Кормилицин Ю.В., 2011).

Воздействие ксенобиотика усиливается при сочетании с другими токсичными веществами и ядохимикатами. При пероральной интоксикации в течение 12 недель крыс линии Wistar инсектицидами (dimethoate, cypermethrin, amitraz) с тяжелыми металлами Pb, Hg и Cd наблюдали значительное изменение относительной массы и активности коры головного мозга (Lengyel Z., Lukács A., Szabó A., Institóris L., 2006). Комбинированная интоксикация хлористым кадмием (1/20 ЛД₅₀) и диоксина (1/200 ЛД₅₀) к 30 сут вызывало увеличение количества металла в тех же органах кроликов на 34-58% (Вафин И.Ф., 2010). А при совместном внутрижелудочном введении CdCl₂, диоксида титана, кремния и фуллеренола крысам в течении 29 сут наблюдали увеличение содержания Cd в 34-45 раз (Шумакова А.А., Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Сото С.Х., Мальцев Г.Ю., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А., 2015).

Аккумулированный в органах и тканях животных металл вызывает цитолиз или пролиферацию клеточных структур. Интоксикация крыс линии Wistar CdCl₂ в дозе 6,43 мг/кг приводила к замедлению прироста массы тела, повышению относительной массы и гистологическим изменениям печени (Institóris L., Siroki O., Desi I., Ünder Ü., 1999). Степень поражения печени и связанных с ним нарушений белкового обмена зависит от концентрации вводимого металла (Жаксылыкова А.К., Амабаев Ы.А., Ткаченко Н.Л., 2014). Снижаются показатели клеточного дыхания, за счет функциональных нарушений структур митохондрий и накопления металла в них (Adiele R.C., Stevens D., Kamunde C., 2011).

Ионы Cd воздействуют на миокард, развивается фиброз, увеличивается количество клеток с признаками апоптоза и некроза (Tukan A, Messner B., Prohaska Th., Bernhard D., 2011). Интоксикация ацетатом кадмия (I) с питьевой водой (10 мг/л) в течении 30 сут крыс линии Wistar сопровождается увеличением индекса пролиферации клеток предстательной железы (Lacorte L.M., Delella F.K., Porto Amorim E.M., Justulin L.A., Godinho A.F., Almeda A.A., Pinheiro P.F., Amorim R.L., Felisbino S.L., 2011). Присутствие металла негативно влияет на пресинаптические структуры мозга (Borisova T., Krisanova N., Sivko R., Kasatkina

L., Borisov A., Griffin S., Wireman M., 2011). Котельникова С.В. с соавторами (2011) установила зависимость токсического воздействия CdCl_2 (1/3 LD_{50}) на тимус, щитовидную железу и селезенку от времени года и пола крыс.

Из-за сродства с биметаллами Cd снижает активность металлоферментов, ингибирует активность антиоксидантной системы, приводит к образованию свободных радикалов и усилению процессов перекисного окисления липидов (Киреев Р.А., 2005; Степанова Е.В., Слюзова О.В., Бучарская А.Б., Киреев Р.А., Игнатов В.В., 2008). Мирзоев Э.Б. с соавторами (2014) в своей работе указывают на активацию синтеза металлотioneинов, увеличение концентрации малонового диальдегида, как продукта ПОЛ при хронической интоксикации крыс нитратом кадмия, растворенного в питьевой воде в дозе 0,05 и 0,1 мг/л. При ежедневном пероральном введении водного раствора CdCl_2 (23,5 мг/мл) к 7 сут у белых беспородных мышей количество МДА увеличивалось в 1,5 раза в мембранах клеток эритроцитов и в 4,5 раза – клеток печени (Слепцов И.В., Поскачина Е.Р., Воронов И.В., 2015).

Хлорид кадмия в дозе 0,25 мг/л в среде при содержании воблы приводит к повышению активности суммарных нейтральных протеаз в печени в течении 30 сут исследования (Исмаилова С.И., Исуев А.Р., Нурмагомедова П.М., 2011). Ершов Ю.А. и Плетенева Т.В. (1989) указывают на дозозависимую способность ксенобиотика изменяться каталазную активность.

Поступление ионов кадмия в организм приводит к нарушению белковообразовательной функции печени и метаболизма железа, что является одним из факторов развития гипертонической болезни (Elsenhans B., Hunder G., 1996). Коллектив авторов (Куршакова Е.И., Бикташев Р.У., Папуниди К.Х., Кадиков Р.И., 2015) сообщает, что при экспериментальной хронической интоксикации бычков CdCl_2 с рационом в концентрации 0,6 мг/кг и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ – 10 мг/кг (2ПДК) к концу опыта (60 сут) наблюдается повышение показателей активности ферментов группы аминотрансфераз, щелочной фосфатазы, указывающее на функциональные нарушения клеточных структур печени, и

нарушение белкового обмена, выражающееся в увеличении содержания креатинина и мочевины. Концентрация общего белка в сыворотке крови белых крыс при интоксикации Cd в той же дозе снижается, тогда как количество глобулиновых фракций увеличивается (Кадиков И.Р., 2015). Подобная картина наблюдается и при субхронической затравке кроликов CdCl₂ (1,5 мг/кг с кормом) в течении 30 сут (Софронова С.А., 2008).

Кадмий блокирует сульфгидрильные группы белковых и небелковых соединений (Давлетов Э.Г., Сорокина В.С., 1979; Braude G.L, Nash A.M., Wolf W.J., Carr R.L., Chaney R.L., 1980). Дорожкин В.И. с соавторами (2012), изучая функциональное состояние почек белых крыс при введении в рацион CdCl₂ в дозе 25 и 50 мг/кг, установили снижение уровня сульфгидрильных групп в крови и увеличение аминолевулиновой кислоты в моче. Установлено, что ежедневная интоксикация в течении 28 сут CdCl₂ (5 мг/кг) приводит к повышению в сыворотке крови крыс количества мочевины и креатинина, сопровождающееся снижением активности каталазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы (Renugadevi J., Prabu S.M., 2009).

Токсический стресс, вызванный хронической интоксикацией соединениями кадмия, сопровождается увеличением концентрации адреналина и норадреналина в крови и приводит к морфофункциональным нарушениям тканей надпочечников (Жапаркулова Н.И., Ерназарова А.Е., Рахмаева З.Т., 2015).

Ионы кадмия нарушает метаболизм нуклеиновых кислот. Установлено, что ксенобиотик подавляет ген репарации ДНК и замедляет экспрессию мРНК (Al Bakheet S.A., Attafi I.M., Maayah Z.H., Abd-Allah A.R., Asriri Y.A., Korashy H.M., 2013). В регионе, загрязненном кадмием, установлено повышение экспрессии 137 генов и снижение – 80 в клетках крови женщин, корреляция изменения уровня экспрессии с количеством Cd в крови и моче подтверждена опытами на мышах (Satoru D., Tomoko K., Hirokazu U., Mineyoshi H., Etsuko O., Hyogo H., Fujio K., Keiko A., Satoshi S., Kazuhito R., Kokichi A., 2009). В результате исследования сперматогенеза дрозофилы установлено увеличение количества доминантно

летальных мутаций при воздействии Cd (II) (Чопикашвили Л.В., Зангиева М.С., Гагкаева З.В., Пухаева Е.Г., Фарниева Ж.Г., 2012). Хроническая интоксикация малыми дозами кадмия, поступающего в организм с табачным дымом, оказывает цитотоксическое воздействие и не имеет цитогенетического эффекта (Агбальян Е.В., Шинкарук Е.В., 2015.).

Токсическое поражение внутренних органов оказывает влияние на показатели естественной резистентности, гемопоэза, клеточного и гуморального иммунитета. Под действием ионов кадмия снижается уровень гемоглобина, меняется количественное соотношение компонентного состава крови, выражающееся в лейкопении и эозинофилии (Кривоногова А.С., Исаева А.Г., Баранова А.А., 2013). Хлорид кадмия в дозе 9 мг/кг (1/20 ЛД₅₀) в опыте на белых крысах снижает количество лейкоцитов, фагоцитарную активность и активность лизоцима (Папуниди К.Х., Иванов А.В., Кадиков И.Р., Трemasов М.Я., 2012). Та же картина сохраняется при затравке в дозе 2ПДК (0,6 мг/кг корма), однако на 60 сут исследования лизоцимная активность соответствовала норме (Кадиков И.Р., 2015).

Экспериментальная интоксикация мышей сульфатом кадмия в дозе 40 мг/на гол. вызывает двукратное снижение относительного количества сегментоядерных нейтрофилов и трехкратное повышение эозинофилов на 15 сут исследования (Ткаченко Е.А., Дерхо М.А., 2015). При воздействии сублетальных концентраций металла (10,62, 17,70 и 24,78 мг/л) рыб *Tilapia zillii* сохраняются гематологические и физиологические изменения крови (Ghazaly K.S., 1999).

Ионы металла образуют комплексы с иммунокомпетентными клетками и белками, воздействуют на активацию Т- и В-лимфоцитов (Griem P., Gleichmann E., 1995). Интоксикация CdCl₂ крыс линии Wistar в дозе 6,43 мг/кг вызывала снижение уровня гематокрита и индекса MCV, подавление клеточного иммунного ответа (Institoris L., Siroki O., Desi I., Ünder Ü., 1999).

У животных с высоким уровнем накопления ТМ, в том числе и Cd наблюдается выраженная иммунодепрессия, что проявляется снижением уровня

T-лимфоцитов, увеличением количества ЦИКов и концентрации В-клеток (Донник И.М., Шкуратова И.А., Хасина Э.И., Якубенко Е.В., 2012; Кривоногова А.С., Исаева А.Г., Баранова А.А., 2013). Совместном воздействии Cd и TiO₂ на самцов крыс линии Wistar так же характеризуется иммуносупрессией T-клеточного звена (Шумакова А.А., Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Сото С.Х., Мальцев Г.Ю., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А., 2015).

В то же время ионы кадмия активируют гуморальное звено иммунитета, стимулируя выделение иммуноглобулинов (Hurtenbach U., Oberbarnsheidt J., 1988). При хроническом воздействии кадмием хлористым у мышей линии B10-A-2R обнаружено сильное угнетение числа и позднее образование IgG и IgM бляшкообразующих клеток (БОК). При этом восстановительный период, в течение 1 месяца после прекращения введения CdCl₂, не привел к увеличению IgM БОК, а увеличение IgG БОК было минимальным (Bozelka В.Е., Burkholder Р.М., 1978). В дозах, не превышающих ПДК, Cd оказывает иммуносупрессивное действие в отношении IgA и IgE, митоген-индуцированной стимуляции пролиферации иммуноцитов (Застенская И.А., Пивень Н.П., Кочубинский В.В., Кочубинский А.В., 2014).

Токсический иммунодефицит усиливается при совместном введении с рационом радионуклидов и ТМ. При добавлении в рацион беспородных белых крыс Cd и Pb в концентрации 10 МДУ и ¹³⁷Cs и ⁹⁰Sr (1500 и 5000 Бк/кг соответственно) количество T- и В-клеток снижалось, угнеталась их функциональная активность (Жоров Г.А., Рубченков П.Н., Обрывин В.Н., 2011).

У мышей была отмечена кадмий индуцированная спленомегалия и гиперплазия селезенки на фоне хронической интоксикации. (Bozelka В.Е., Burkholder Р.М., Chang L.W., 1978; Berche P., Simonet M., Thévenin M., Fauchère J.L., Prat J.J., Véron M., 1980). Дмитруха Н.Н. (2010) в своей статье указывает на то что при внутрижелудочном введении самцам белых не линейных крыс малых доз сульфата кадмия (0,4 мг/кг живой массы) ксенобиотик оказывает

стимулирующее действие на спонтанную пролиферацию лимфоцитов селезенки, сопровождающееся снижением их ответа на митогены.

В лимфатических узлах печени при экспериментальной хронической кадмиевой интоксикации самцов крыс установлена активация В-звена иммунной системы, при этом наблюдается увеличение площади В- и уменьшение Т-зависимых структур. При этом экзотоксикоз выражен в снижение числа малых и средних лимфоцитов, возрастание числа бластных форм (Жаксылыкова А.К., Аламбаев Ы.А., Ткаченко Н.Л., 2014).

Многие зарубежные и отечественные авторы отмечают влияние соединений кадмия на резистентность организма к инфекционным заболеваниям, патогенез и сам возбудитель. Так хроническое воздействие $CdCl_2$ вызывает увеличение восприимчивости мышей к внутриклеточным патогенам (*Listeria monocytogenes*), что не наблюдалось в случаях с внеклеточно размножающимися микроорганизмами (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) (Berche P., Simonet M., Thévenin M., Fauchère J.L., Prat J.J., Véron M., 1980).

Устойчивость к листериям (*L.monocytogenes*) у мышей линии C57BL/6, нарушается при хронической интоксикации хлористым кадмием (0,5 мг/кг внутрибрюшинно). Восприимчивость к возбудителю увеличивалась за счет нарушения неспецифического, связанного с дефектом набора макрофагов в очаге инфекции на ранней стадии иммунного ответа, и не было вызвано угнетением специфического иммунитета (Simonet M., Berche P., Faucher J.L., Veron M., 1984).

На фоне кадмиевой интоксикации усиливается вирулентность бактерий рода *Micobacterium* и усугубляет течение инфекционного процесса. При хроническом воздействии $CdCl_2$ наблюдается увеличение смертности мышей, инфицированных *M.bovis* штаммом BCG (Bozelka V.E., Burkholder P.M., 1979). У затравленных в течение 9 месяцев солями кадмия, свинца, хрома, тетрахлордibenзодиоксином и полихлорированными бифенилами в дозах, ниже ПДК, морских свинок после инфицирования микобактериями *M.bovis*-8 отмечается более тяжелое течение туберкулезной инфекции, прогрессирующая

потеря живой массы, достоверно более интенсивные аллергические реакции на туберкулин (ППД) для млекопитающих и комплексного аллергена атипичных микобактерий (КАМ) (Застенская И.А., Лысенко А.П., Кочубинский В.В., Кочубинский А.В., 2014).

Эпидемиологическими исследованиями установлены статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение концентрации кадмия в образцах волос больных туберкулезом людей и пациентов с офтальмологическими проблемами, гипертонией и психологическими проблемами. При этом никакой корреляции с кадмием не было получено у пациентов с сердечными заболеваниями, диабетом, гепатитом, заболеваниями дыхательных путей, дерматитами и гипотонией (Mehra R., Juneja M., 2005). Результаты клинических исследований показали значительно более высокие уровни кадмия ($p < 0,001$) в образцах волос, крови и мочи пациентов с синдромом иммунодефицита человека (AIDS), по сравнению с контрольной группой. При этом отмечается, что высокие уровни кадмия могут быть прогностическими факторами туберкулеза и других вторичных инфекций у больных с вирусом иммунодефицита человека (HIV) (Afridi H.I., Kazi T.G., Kazi N., Kazi T.G., Kazi N., Kandhro G.A., Shah A.Q., Baig J.A., Khan S., Kolachi N.F., Wadhwa S.K., Shah F., 2011).

Присутствие в питательной среде солей кадмия активирует синтез кадмий индуцируемого белка 17 кДа (CadI) микобактериями МТВ complex, *M. bovis* и *M. tuberculosis*, но не быстрорастущими *M. smegmatis*, что обусловлено кодирующим геном Rv2641. При этом синтез CadI не вызывается окислительным стрессовым состоянием, добавлением гидропероксида кумола или термическим шоком, равно как и солями свинца, ртути, марганца, кобальта, цинка, железа или мышьяка (Hotter G.S., Wilson T., Collins D.M., 2001).

1.2 Этиология, патогенез и диагностика туберкулеза

Туберкулез в РФ и мире в целом носит характер эпидемии (Онищенко Г.Г., 2003). По данным Всемирной организации здоровья (ВОЗ), туберкулез (ТБ) входит в десятку ведущих причин смерти от какого-либо одного инфекционного агента, наряду с HIV и AIDS (ВОЗ, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016). В Российской Федерации в 2010 году зарегистрировано 72,7, в 2011 – 76,5, в 2012 – 67,7 случаев ТБ на 100 тысяч населения (Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2013). Заболеваемость крупного рогатого скота в РФ так же остается на высоко уровне (Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2013). В 2012 году в первые за предыдущие 15 лет был отмечен рост заболеваемости числа заболевших животных, на 963 головы больше показателя 2011 года, и количества новых неблагополучных пунктов по туберкулезу крупного рогатого скота до 11 (Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Коломыцев С.А., Ткач Н.М., 2013).

На эпизоотологическую ситуацию оказывают влияние различные экологические факторы, действие которые необходимо принимать во внимание при противотуберкулезных мероприятиях (Застенская И.А., Лысенко А.П., Кочубинский В.В., Кочубинский А.В., 2014; Ощепков В.Г., 2004; Смирнов А.М., Дорожкин В.И., Рубченко П.Н., 2010; Шкаева Н.А., 2010; Mehra R., Juneja M., 2005). Колычев Н.М. и Кисленко В.Н. (2014) в своей статье отмечают перспективность применения экологического подхода, учитывающего источники инфекции, животных носителей, условия миграции, морфологическую трансформацию и валентность возбудителя.

В циркуляции возбудителей ТБ принимают участие дикие, сельскохозяйственные, домашние декоративные животные и кровососущие членистоногие (Овдиенко Н.П., Науманов А.Х., Толстенко Н.Г., Хруленко В.Н.,

Яременко Н.А., Рахманин П.П., Мельник Н.В., Крюков С.В., Боровой В.Н., 2009; Ощепков В.Г., Бордюк В.Ф., Кошечев Н.Н., Панкратова А.Д., Гардер А.Г., 2012; Шуралев Э.А., 2012; Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Валеева А.Р., Васин А.А., Иванов А.В., Велан К., 2013). Описаны случаи туберкулеза в смешанном стаде крупного рогатого скота и коз, при этом выявлена идентичность геномного профиля возбудителя у обоих видов животных (Zanardi G., Boniotti M.B., Gaffuri A., Casto V., Zanoni M., Rassiarini M.L., 2013). В Новой Зеландии ТБ распространен среди опоссумов, красных оленей, хорьков и диких кабанов (Nugent G., 2011). Инфицированность ТБ на юге Испании среди диких кабанов достигает 52%, а в популяции красного оленя 27% (Gortazar C., Vicente J., Boadella M., Ballesteros C., Galindo R.C., Garrido J., Aranaz A., de la Fuente J., 2011).

Микобактерии – грамположительные, кислотоустойчивые, аэробные, палочковидные или нитевидные бактерии. Их относят к отряду Actinomycetales, семейству Micobacteriaceae, роду Micobacterium (Whitman W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K.-I., Parte A., 2012). По скорости роста выделяют быстрорастущие, медленно растущие и не растущие на искусственных средах микобактерии, а по способности образовывать пигменты выделяют фотохромогенные, скотохромогенные и нефотохромогенные виды микобактерий (Runyon E.H., Karlson A.G., Kubica G.P., Wayne L.G., 1981).

По патогенности выделяют патогенные, потенциально патогенные и сапрофитные микобактерии (Ерохин В.В., Гольшевская В.И., Севастьянова Э.В., Шульгина М.В., 2008). К патогенным для млекопитающих микобактериям относят бактерии туберкулезного комплекса (МТВ complex), нетуберкулезного комплекса (NTM) и *M.leprae* (возбудитель проказы) (Рисунок 1).

The Taxonomic Tree for Selected Mycobacteria and Related Species

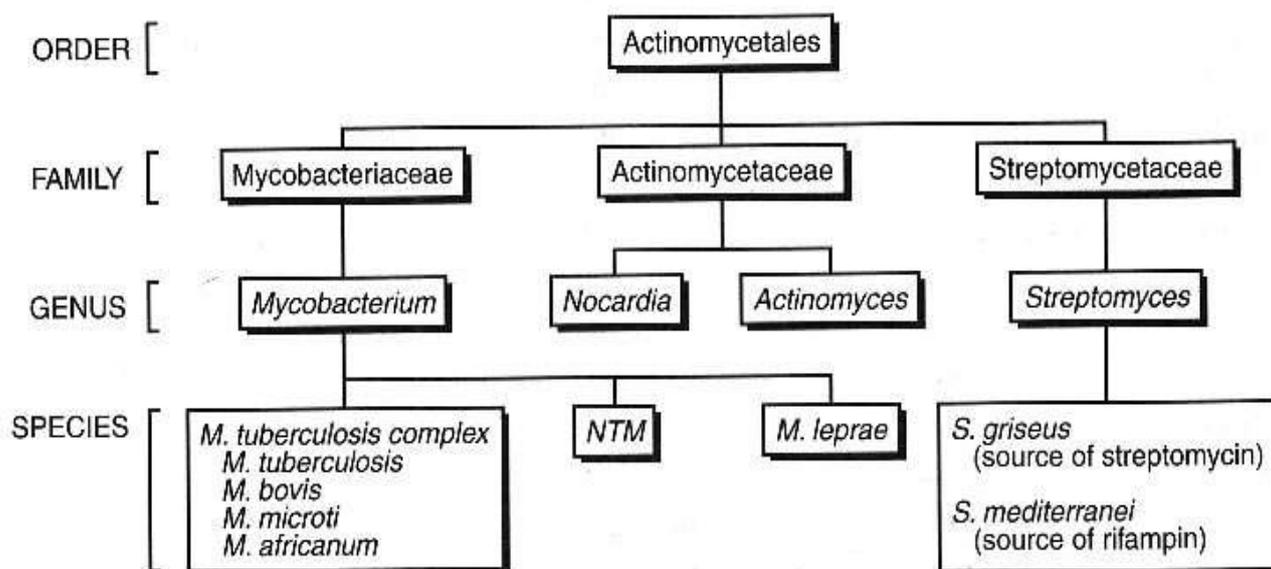


Рисунок 1 – Таксономическое дерево некоторых микобактерий и родственных видов (Michael D. Iseman, 2000)

К МТВ complex относят *M.tuberculosis* (возбудитель туберкулеза человеческого типа), *M.bovis* (возбудитель туберкулеза бычьего типа), *M.africanum*, *M.microti*, *M.canettii*, к нему отнесены *M.pinnipedii* и *M.caprae*, филогенетически имеющие отношение к *M.microti* и *M.bovis* (Iseman M.D., 2000). Существенным отличием микобактерий NTM, к которым относят микобактерии комплекса *avium-intracellulare* (MAIS), является то, что они практически не передаются от человека к человеку или от животного к животному, при этом в иммуносупрессивном состоянии приводят к заболеванию микобактериозами (Старкова Д.А., 2013).

Романенко В.Ф. (2006) считает, что биологические свойства патогенных микобактерий нестабильны, а распределение по видам условно, так как генетически являются производными одного возбудителя. Пассажируя *M.tuberculosis*, *M.bovis* и *M.avium* на телятах, курах и морских свинках была

доказана способность бактерий приобретать новые, нехарактерные для себя свойства и, постепенно адаптируясь внутри несвойственного организма, усиливать свою патогенность (Романенко В.Ф., 2013). Методом полимеразной цепной реакции установлено, что 2 % туберкулеза легких среди 448 пациентов с поставленным диагнозом ТБ из различных регионов Аргентины вызвано микобактериями бычьего типа (Etchechoury L., Echeverria Valencia G., Morcillo N., Sequeira M.D., Imperiale B., Lopez M., Caimi K., Zumarraga M.J., Cataldi A., Romano M.I., 2010).

Высокая заболеваемость туберкулезом среди людей и сельскохозяйственных животных обусловлена особенностью строения и химического состава клеточной стенки микобактерий, способностью к L-трансформации, сохранять жизнеспособность под действием внешних неблагоприятных факторов и возможностью перекрестного заражения различными микобактериями (Смирнов А.М., 2004). По данным Прокопьевой Н.И. (2004) в естественных условиях вечной мерзлоты *M.bovis* сохраняет жизнеспособность на поверхности почвы 12 мес, на глубине – до 60 мес, а в навозе – до 48 мес, тогда как *M.avium* выживает в навозе до 24 мес. Установлено, что в высохших фекалиях на пастбище летом они выживают до 2 мес, а зимой – до 5 мес (Смирнов А.М., 2004).

Устойчивость к неблагоприятным воздействиям, патогенность микобактерий и их взаимоотношения с макрофагами обусловлены их строением (McNiel M.R., Brennan P.J., 1991). Клеточная стенка микобактерий гидрофобная и включает в себя следующие компоненты: плазматическую мембрану и комплекс полимеров, связанных с ней (Рисунок 2). Плазматическая мембрана состоит из пептидогликанов, арабиногалактана, и миколовых кислот, которые включают в себя метоксигруппы и кетогруппы (Блум Б.Р., 2002; Iseman M.D., 2000). Миколовые кислоты фиксированы в каркасе клеточной стенки, образуют корд-фактор, участвующий в образовании гранул (Маянский А.Н., 2000). Важную роль играет и такой компонент клеточной стенки, как липоарабиноманнан (ЛАМ),

который является инициатором «неагрессивного» фагоцитоза и ингибирует пролиферацию Т-клеток (Маянский А.Н., 2000; Barnes P.F., Chatterjee D., Abrams J.S., Lu S., Wang E., Yamamura M., Brennan P.J., Modlin R.L., 1992; Chatterjee D., Khool K.-H., 1998). Установлено, что манноолигосахариды способствуют возникновению гранулем, образованных лимфоцитами и активными фагоцитами (Авербах М.М., 2012).

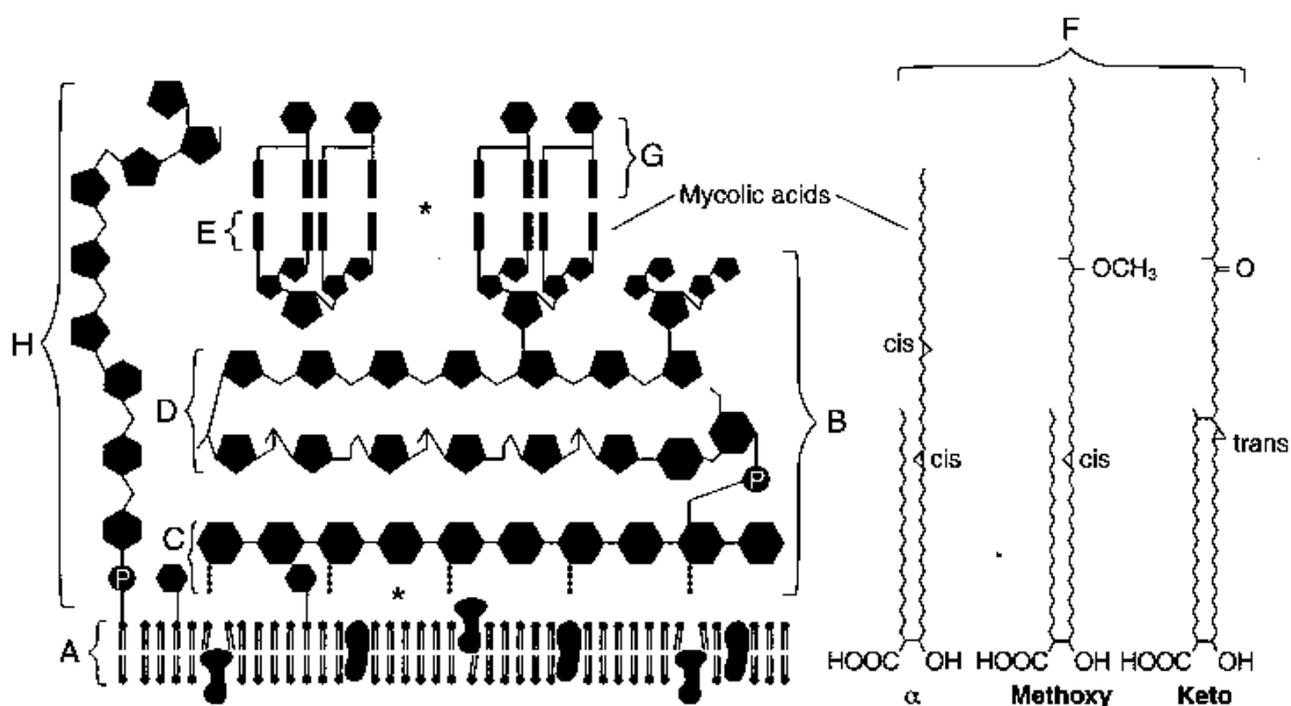


Рисунок 2 – Схема клеточной стенки туберкулезной бактерии (Michael D. Iseman, 2000):

А – плазматическая мембрана; **В** – комплекс полимеров; **С** – пептидогликаны; **Г** – арабиногалактан; **Е** – миколиновые кислоты; **Ф** – метоксигруппы и кетогруппы; **Н** – второй бислой.

Еще одним фактором устойчивости микобактерий является способность к L-трансформации. Так при исследовании проб объектов внешней среды и внутренних органов крупного рогатого скота на территории Омской и Челябинской областей были выделены L-формы *M.bovis*, *M.avium*, *M.gordonaе*, *M.scrofulaccum*, *M.fortuitum*, *M.chelonei*, *M.smegmatis*, *M.terrae*, *M.diernhoferi*

(Ощепков В.Г., Таллер Л.А., Галатова Л.В., Абдыраманова Т.Д., Секин Е.Ю., Дюсенова Г.М., 2007).

Существует несколько путей заражения бактериями рода *Mycobacterium*: воздушно-капельный, алиментарный, контактный и внутриутробный (Перельман М.И., 2007). Известно, что при первичном инфицировании микобактериями макроорганизм способен вывести инфекционный агент (Блум Б.Р., 2002). При этом основным инструментом распознавания инфекционного агента и активации макрофагов является Т-клеточный иммунитет, который определяет и дальнейшую резистентность организма к возбудителю (Верховский О.А., Найманов А.Х., Савицкая О.А., 2006; Hernandez C., Cetner A.S., Jordan J.E., Puangsuwan S.N., Robinson J.K., 2008).

Однако даже при формировании тканевой защиты под действием мононуклеарных фагоцитов и Т-лимфоцитов заболевание может переходить в латентную стадию и активироваться в условиях иммунного дисбаланса (Блум Б.Р., 2002; Перельман М.И., 2007). Микобактерии за счет секретируемых продуктов жизнедеятельности модулирует функциональную активность макрофагов и оказывают защитное действие при кислородной интоксикации. Установлено, что бактерии способны блокировать созревание фагосом в макрофагах организма и индуцировать образование гранул (Russell D.G., 2011). Инфицирование перитонеальных макрофагов мышей линии C57B1/6 штаммами микобактерий *M.bovis* BCG и *M.tuberculosis* H37Rv, по экспрессии субъединиц LMP2, MECL1 и LMP7, приводит к ингибированию формирования иммунопротеасом и снижению их функциональной активности, что препятствует механизму распознавания инфекционного агента иммунной системой организма хозяина (Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Тимофеев А.В., Ларионова Е.Е., Черноусова Л.Н., 2014). Очаги гранулематозного воспаления патогенными микобактериями используются для размножения и дальнейшего системного распространения (Muse Davis J., Ramakrishnan L., 2009). Кроме того, в качестве транспортного средства для распространения из легких в лимфатические узлы и

другие органы *M.tuberculosis* использует дендритные клетки (Bodnar K.A., Serbina N.V., Flynn J.L., 2001).

При ослаблении иммунных реакций и иммунодефицитах наблюдается формирование диссеминированной формы и патологических процессов, вызванных как микобактериями MTB complex, так и атипичными (Bermudez L.E., Wagner D., Sosnowska D., 2000; Raju B., Schluger N.W., 2000). При изучении пациентов имеющих HIV-positive статус установлено, что Co-infection (вторичной инфекцией) при HIV часто является диссеминированная форма ТБ, вызванная микобактериями *Mycobacterium avium complex* (MAC), тогда как у больных отрицательных на HIV диагностировался преимущественно активная форма ТБ (Raju B., Schluger N.W., 2000). Острая фаза HIV, снижение CD4⁺ Т-клеток и высокая вирусная нагрузка, приводят к реактивации латентного туберкулеза (Mattila J.T., Diedrich C.R., Ling Lin P., Phuah J., Flynn J.L., 2011).

При ТБ формируется иммунопатологическая реакция гиперчувствительности замедленного типа и в зависимости от характера течения инфекционного процесс выделяют Th-1 и Th-2 иммунного ответа (Перельман М.И., 2007; Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Новицкий В.В., Воронкова О.В., Михеева К.О., Игнатов М.В., Филинюк О.В., Новосельцева О.И., Степанова Е.П., 2012). Выведение инфекционных агентов осуществляется за счет системы макрофагов, а в формировании иммунной защиты основную роль играет Т-клеточный иммунитет (Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2014). При латентной инфекции ТБ выявляются CD4 и CD8 Т-клетки, экспрессируют Th1 цитокины: интерферон- γ (IFN- γ), интерлейкин 2 (IL-2), фактор некроза опухоли α (TNF- α) и цитокины Th2 типа: IL-4 и IL-10 (Mattila J.T., Diedrich C.R., Ling Lin P., Phuah J., Flynn J.L., 2011). Патогенез ТБ сопровождается угнетением Th1- и активацией Th2-иммунного ответа, выраженного в снижении продукции IL-2 и повышении – IL-4 и IL-5, гиперпродукция которых зависит от формы заболевания (Новицкий В.В., Чурина Е.Г., Уразова О.И., Колобовникова Ю.В., Кононова Т.Е., Воронкова О.В., 2012).

В лимфатических узлах, экспериментально зараженных *M.bovis* животных на ранних стадиях наблюдаются повреждения, обусловленные увеличением количества макрофагов и многоядерных гигантских клеток, умеренным количеством кислотоустойчивых микобактерий, минимальным некрозом с минерализацией и гетерогенной популяцией лимфоцитов CD4⁺, CD8⁺, и γ/δ Т-клеток, которая сокращается при прогрессировании заболевания (Palmer M.V., Waters W.R., Thacker T.C., 2007). Угнетение продукции $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов у больных ТБ указывает на неэффективности механизмов первой линии иммунной защиты (Новицкий В.В., Чурина Е.Г., Уразова О.И., Колобовникова Ю.В., Кононова Т.Е., Воронкова О.В., 2012).

Установлено увеличение монопозитивных TNF- α ⁺ специфичных с CD4⁺ Т-клеток при активной форме ТБ (Harari A., Rozot V., Enders F.B., Perreau M., Stalder J.M., Nicod L.P., Cavassini M., Calandra T., Blanchet C.L., Jaton K., Faouzi M., Day C.L., 2011). Салина Т.Ю. (2015) указывает на более высокую продукцию TNF- α у пациентов с экссудативным типом ТБ, чем с продуктивным и здоровыми лицами. У пациентов с тяжелым, прогрессирующим и осложненным течением ТБ в отличие от с пациентами с благоприятно протекающим заболеванием установлено более выраженное снижение функциональной активности иммунокомпетентных клеток, проявляющееся в угнетении продукции IFN- γ и TNF- α (Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2013). При туберкулезе легких выявлено снижение Т-лимфоцитов (CD3) и IFN- γ , при этом количество В-клеток увеличивалось с одновременным нарушением их функциональной активности, что возможно обусловлено доминированием гуморального иммунного ответа (Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Новицкий В.В., Воронкова О.В., Михеева К.О., Игнатов М.В., Филинюк О.В., Новосельцева О.И., Степанова Е.П., 2012; Сахно Л.В., Тихонова М.А., Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Никонов С.Д., Жданов О.А., Останин А.А., Черных Е.Р., 2011). ТБ усугубляет апоптоз Т-клеток, что связано с гиперпродукцией интерлейкина IL-6 и IL-10 и низким уровнем IFN- γ (Сахно Л.В., Тихонова М.А.,

Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Никонов С.Д., Жданов О.А., Останин А.А., Черных Е.Р., 2011).

При ТБ повышается количество $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$, приводящее к иммуносупрессии (Новицкий В.В., Чурина Е.Г., Уразова О.И., Колобовникова Ю.В., Кононова Т.Е., Воронкова О.В., 2012; Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Колосова А.Е., Сионина Е.В., Филинюк О.В., Воронкова О.В., Наследникова И.О., 2012). Чуриной Е.Г. с соавторами (2012) установлена корреляция иммуносупрессии с увеличением секреции IL-10 и снижением уровня продукции TGF β .

Патогенез и разнообразие проявления заболевания осложняют диагностику туберкулеза и требуют применения комплекса лабораторных исследований (Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Гулюкин М.И., Букова Н.К., 2015). Для улучшения эффективности противотуберкулезных мероприятий и достижения эпидемиологического благополучия по ТБ необходима разработка и оптимизация существующих методов своевременной и достоверной диагностики, способных дифференцировать микобактерии и выявлять L-формы (Валеева А.Р., 2012; Ощепков В.Г., 2004; Смирнов А.М., 2004).

В диагностике ТБ среди сельскохозяйственных животных широко распространен метод туберкулиновой пробы, применение которого осложняется возникновением неспецифических реакций (Дубовой Б.Л., Добрелин В.И., 2012; Дубовой Б.Л., Полякова О.Н., 2011; Найманов А.Х., Устинова Г.И., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Кучерук О.Д., 2015). Неспецифические реакции на ППД-туберкулин обусловлены сенсibilизацией животных атипичными микобактериями (Скрыпкин А.В., Скрыпкин В.Г., Завгородний А.И., Стегний Б.Т., Позмогова С.А., 2011). В пробах биологического материала и объектов внешней среды хозяйств, где содержались животные с положительной туберкулиновой пробой и отсутствием изменений внутренних органов и тканей туберкулезного характера, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) обнаружены атипичные микобактерии (Ионина С.В., Донченко Н.А., Донченко

А.С., 2016). В экспериментах на морских свинках установлено сенсibiliзирующее свойство микобактерий 4-й группы по классификации Раньона через 24 ч при заражении микобактериями в дозе 5 мг в 1 мл физиологического раствора (Найманов А.Х., Устинова Г.И., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Кучерук О.Д., 2015). При подкожном введении морским свинкам разных доз *M.xenopi*, *M.intracellulare*, *M.scrofulaceum*, *M.smegmatis* установлена корреляционная зависимость сенсibiliзации животных от дозы вводимого материала (Кощев Н.Н., Бордюг В.Ф., Ощепков В.Г., Панкратова А.Д., Слепченко А.Д., 2012).

Найманов А.Х. с соавторами (2015) указывают на необходимость применения симультанной пробы с ППД и КАМ. Высокой диагностической ценностью обладает безальбумозного туберкулина, кроме того из него получают туберкулезный анатоксин, который обладает иммуногенным эффектом и обеспечивает высокую резистентность иммунизированных животных (Евглевский А.А., Евглевский Д.А., Коваленко А.М., Демин В.А., 2012). Дубовой Б.Л. с соавторами (2011, 2012) указывает на целесообразность применения реакции специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ) для дифференциации туберкулиновой реакции и постановки диагноза. Установлена перспективность применения для определения валидности туберкулиновой пробы хемоллюминесцентного метода, обладающего высокой специфичностью, чувствительностью и позволяющего сократить время постановки диагноза до 4-6 часов (Ощепков В.Г., Таллер Л.А., Дюсенова Г.М., Вассимирская Т.А., Секин Е.Ю., 2009).

Современным методом диагностики ТБ человека в условиях выраженной иммуносупрессии и сенсibiliзованности организма другими микобактериями является диаскинтест, который обладает в отличие от внутрикожной пробы Манту практически 100% специфичностью (Слогацкая Л.В., Филипов А.В., Кочетков Я.А., Сельцовский П.П., Литвинов В.И., 2011).

При постмортальном исследовании животных необходимо проводить тщательный патологоанатомический осмотр внутренних органов в том числе

лимфатических узлов, а при сомнительном результате применять дополнительные методы исследования, биопробу и посев на селективные питательные среды (Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Гулюкин М.И., Букова Н.К., 2015). Смирнов А.М. и Картошова В.М. (2012) установили возможность применения аураминового дискового теста для дифференциации патогенных микобактерий от сапрофитных, который в отличие от цитохимических и методов, основанных на определении активности клеточных ферментов, позволяет получить результат при условии готовности культуры в течении 2-3 мин.

На сегодняшний день существует множество серологических методов диагностики туберкулеза разных видов животных и человека. Установлена возможность применения γ -интерферонового теста для диагностики инфицирования животных *M.avium paratuberculosis* на модели коз (Bezoz J., Juan L., Romero B., Alvarez J., Mazzucchelli F., Mateos A., Dominguez L., Aranaz A., 2010). В исследовании больных, контактных лиц и здоровых доноров установлено высокая диагностическая значимость для определения инфицирования IFN- γ , а для дифференцирования формы ТБ – неоптерина и специфических антител (Васильева Е.В., Лапин С.В., Блинова Т.В., Никитина И.Ю., Лядова И.В., Вербов В.Н., Толян А.А., 2013). Сулейменова М.Т. с соавторами (2015) в своей работе указывают на возможность использования пластинчатой реакции агглютинации с применением высоко чувствительного и специфичного цветного антигена для экспресс-диагностики туберкулеза крупного рогатого скота, результат получают через 3-4 мин.

Иммунологические методы диагностики туберкулеза, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) и иммуноблот, позволяют поставить диагноз человеку, домашним и диким животным в относительно короткие сроки (Хисматуллина Н.А., Хаертынов К.С., Шуралев Э.А., Гулюкин А.М., Найманов А.Х., Ахмадеев Р.М., Мукминов М.Н., Валеева А.Р., 2013; Aurtenetxe O., Barral M., Vicente J., de la Fuente J., Gortázar C., A Juste R., 2008). Однако низкая

чувствительность и отсутствие высокоспецифичных антигенов препятствуют исключению ложноположительных результатов (Альфредо Э., 2013).

Некоторые авторы указывают на перспективность применения комплекса антигенов для повышения чувствительности и специфичности иммунологических реакций, дифференцирующих гетерогенный иммунный ответ при туберкулезе (Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Чернов А.Н., Казарян Г.Г., Валеева А.Р., Хисматуллина Н.А., 2012; Шуралев Э.А., Хисматуллина Н.А., Мукминов М.Н., Валеева А.Р., Велан К., 2012; Шуралев Э.А., 2012; Lyashchenco K.P., Sing M., Colangeli R., Genaro M.L., 2000; Whelan C., Shuralev E., O'Keeffe G., Hyland P., Kwok H.F., Snoddy P., O'Brien A., Connolly M., Quinn P., Groll M., Watterson T., Call S., Kenny K., Duignan A., Hamilton M.J., Buddle B.M., Johnston J.A., Davis W.C., Olwill S.A., Clarke J., 2008). Lyashchenco K.P. с соавторами (2008) указывают на возможность применения тест-систем на основе антигенов ESAT-6, CFP10 и MPB70 для скрининга природных очагов и определения путей передачи ТБ среди диких животных. Установлена возможность применения мультиплексного ИФА с хемолюминесцентной меткой для диагностики туберкулеза у вапити, кабанов и коз (Шуралев Э.А., Ндайишимийе Э.В., Мукминов М.Н., 2012; Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Велан К., Кларк Д., 2013; Shuralev E., Quinn P., Doyle M., Duignan A., Kwok H.F., Bezos J., Olwill S.A., Gormley E., Aranaz A., Good M., Davis W.C., Clarke J., Whelan C., 2012). При исследовании сыворотки крови кабанов на туберкулез активность проявили рекомбинантные антигены rMPB83, rMPB70, rESAT-6, rCFP-10 и rRv3616c и комбинированного антигена PPD-b (Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Валеева А.Р., Васин А.А., Иванов А.В., Велан К., 2013).

Установлено, что антигенный комплекс, содержащий белковые фракции 38, 28, 24 и 19 кДа обладает диагностической значимостью при исследовании сывороток крови пациентов на ТБ в вестерн-блоте (Rovatti E., Corradi M.P., Amicosante M., Tartoni P.L., Panini W., Ancora A., Cenci A.M., Zucchi L., Monno L., Angarano G., Saltini C., 1996). Антигены CFP-10, Mtb8, Mtb48, MPT32, Mtb81 и белок с молекулярной массой 38 кДа могут быть использованы для ИФА у

пациентов ТБ и с сопутствующим HIV (Houghton R.L., Lodes M.J., Dillon D.C., Reynolds L.D., Day C.H., McNeill P.D., Hendrickson R.C., Skeiky Y.A., Samraio D.P., Badaro R., Lyashchenko K.P., Reed S.G., 2002). На эффективность диагностики ТБ иммунологическими методами влияет иммунодефицитные состояния организма, что выражается в снижении чувствительности (Цибулькин А.П., Хаертынова И.М., Герасимова С.В., Хаертынов К.С., 2013). Установлена ценность спектра белков из *M.tuberculosis* с молекулярной массой 6,5-29 кДа в реакции иммуноблот с сыворотками крови пациентов с туберкулезом легких и ТБ+HIV (Цибулькин А.П., Хаертынова И.М., Уразов Н.Г., Хаертынов К.С., 2016). Нами были выделены антигенные препараты из *M.bovis* Bovinus-8, *M.bovis* Vallee-88, *M.bovis* BCG, *M.tuberculosis* H37Rv и доказана их высокая активность в реакциях ИФА и иммуноблот (Хисматуллина Н.А., Хаертынов К.С., Шуралев Э.А., Гулюкин А.М., Ахмадеев Р.М., Волобуева Н.В., Мукминов М.Н., Валеева А.Р., Москивева А.В., 2014; Хисматуллина Н.А., Хаертынов К.С., Шуралев Э.А., Гулюкин А.М., Мукминов М.Н., Валеева А.Р., Москивева А.В., 2014).

Еще одним методом диагностики является полимеразная цепная реакция (ПЦР), с помощью которой можно в короткие сроки и при малой концентрации генетического материала микобактерий определить геном возбудителя (Александрова Н.М., Фаизов Т.Х., Иванов А.В., Фахретдинов И.К., 2011; Тупота Н.Л., Тупота С.Г., Донченко Н.А., 2012). Он позволяет выявить не только микобактерии, но и дифференцировать *M.tuberculosis* от других бактерий МТВ complex (Донченко Н.А., Донченко А.С., Семенихин В.И., 2004). Однако данный метод не включен в перечень рекомендованных при диагностике туберкулеза, так как применение метода ограничено сложностью пробоподготовки и требованиями к оснащенности лабораторий (Найманов А.Х., Вангели Е.П., Толстенко Н.Г., Калмыкова М.С., 2016). Першикова Н.Л. и Донченко Н.А. (2007) указывают на несоответствие бактериологических исследований и результатов ПЦР биоматериала птиц и крупного рогатого скота неблагополучных хозяйств. Alinovi С.А. с соавторами (2009) указывают на соответствие ПЦР и культуральных

методов и рекомендуют его как более точный для идентификации *M.avium* ssp. *paratuberculosis*. Группой авторов установлено, что наиболее эффективно применение данного метода для исследования смывов с питательной среды после предварительных посевов суспензий проб биологического материала (Ощепков В.Г., Таллер Л.А., Секин Е.Ю., Вассимирская Т.А., Слепченко А.Д., 2010; Таллер Л.А., Ощепков В.Г., Секин Е.Ю., Янченко Т.А., 2011).

Таким образом, широкое распространение, особенности патогенеза, разнообразие локализации, модулирование инфекционного процесса и возбудителя под действием различных факторов обуславливают актуальность в теоретическом и прикладном аспекте изучения влияния ТМ на примере кадмия на функциональное здоровье организма при экспериментальном ТБ.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2 Материалы и методы исследования

Работа выполнена на базе кафедры прикладной экологии Института экологии и природопользования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», экспериментальная часть по инфицированию и интоксикации в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности (ФЦТРБ-ВНИВИ)» в соответствии с договором о сотрудничестве.

Экспериментальные исследования проводили на модельных животных – кроликах весом 3-3,5 кг. Животные были разделены на 4 группы по принципу аналогов с учетом породы, возраста, пола и массы тела. В период проведения эксперимента условия кормления и содержания всех животных были одинаковыми и соответствовали существующим зоотехническим нормам. Исследование проводили в соответствии с требованиями комиссии по биоэтике ФЦТРБ-ВНИВИ.

В работе использован возбудитель туберкулеза *M. bovis* Bovinus-8. Штамм микобактерий предоставлен ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ). Микобактерии культивировали на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена, 6 недель в термостате при температуре 37°C. Среда была приготовлена по классическому рецепту в лаборатории культуры клеток и питательных сред ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Далее колонии клеток снимали с поверхности питательной среды с помощью бактериологической петли и пятикратно отмывали стерильным физиологическим раствором. Подготовленные таким образом

бактерии использовали для инфицирования экспериментальных животных, выделения антигенных фракций белков для серологических исследований и как контрольный штамм при идентификации возбудителя.

Для создания модели хронической интоксикации использован хлористый кадмий (CdCl_2 , ГОСТ 4330-66).

До хронической интоксикации и инфицирования кроликов проверяли на зараженность туберкулезом путем постановки туберкулиновой пробы с использованием ППД млекопитающих (ФКП «КУРСКАЯ БИОФАБРИКА – ФИРМА «БИОК»») согласно Наставлению по применению (ППД) туберкулинов для млекопитающих. Препарат вводили внутрикожно в районе уха. Кожная аллергическая реакция на введение отсутствовала.

Кролики 1-ой и 3-ей групп подвергались хронической интоксикации тяжелыми металлами (табл. 1).

Таблица 1 – Схема опыта на модельных животных

Группа	Хроническая интоксикация	Инфицирование
1 n=3	ежедневно в течение 60 сут перорально CdCl_2 - 1,5 мг/кг	подкожно 1 мл физиологического раствора
2 n=3	ежедневно в течение 60 сут перорально плацебо (вода)	подкожно 1 мл суспензии <i>M.bovis</i> Bovinus-8 (10 ЕД м.т./мл)
3 n=3	ежедневно в течение 60 сут перорально CdCl_2 - 1,5 мг/кг	подкожно 1 мл суспензии <i>M.bovis</i> Bovinus-8 (10 ЕД м.т./мл)
4 n=3	ежедневно в течение 60 сут перорально плацебо (вода)	подкожно 1 мл физиологического раствора

Водный раствор CdCl_2 вводили ежедневно, в течение 60 дней, в желудок в дозе 1,5 мг на кг живого веса (1/100 часть ЛД₅₀ для кроликов) при помощи тонкого эластичного зонда (катетер, питающий с рентгеноконтрастной полосой метрический, 50 см, ConvaТес) с применением кляпа. Животным 2-ой и 4-ой

групп в течение всего эксперимента вводили дистиллированную воду по той же схеме.

На 15 сутки от начала эксперимента кроликам второй и третьей групп в области правого бедра подкожно ввели 1 мл суспензии, содержащей 1 миллиард живых клеток *M. Bovis* Bovinus-8 (10 ЕД микробных тел/мл по стандартному отраслевому образцу мутности бактериальных взвесей, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России) с неполным адьювантом Фрейнда (Frend's Incomplete Adjuvant, Thermo Scientific).

В ходе эксперимента оценивали состояние здоровья модельных животных анализируя комплекс количественных параметров: физических – измеряли массу тела, температуру; биохимических – гематологические, иммунологические и клиничко-биохимические показатели крови в динамике инфекционного процесса на фоне интоксикации хлористым кадмием. Изучение патогенеза туберкулеза у кроликов экспериментальных групп контролировали патоморфологическими и гистологическими исследованиями внутренних органов животных, посевами на селективные питательные среды с дальнейшим определением изменчивости выделенных микобактерий и их соответствия исходному штамму *M.bovis* Bovinus-8 методом ПЦР.

Взвешивали кроликов через каждые 7 суток с помощью электронных тензометрических весов для статического взвешивания настольного типа с диапазоном измерения от 40 г до 15 кг и погрешностью в 2 г. Температуру тела измеряли ежедневно ректально медицинским термометром WT-03 base компании B.Well с диапазоном измерения от 32°C до 44°C и шагом измерения 0,1°C, согласно инструкции по эксплуатации прибора.

Взятие крови из краевой вены уха кролика проводили каждые 7 сут эксперимента по стандартной методике с использованием вакуумных пробирок для забора крови с активатором свертывания (Vacuette Serum Clot Activator, Greiner Bio-One) и антикоагулянтом (с литий-гепарином, IMPROVACUTER).

Исследования крови заключались в определении лейкоцитарной формулы по общепринятой методике (Кондрахин И.П., 2004). При биохимическом исследовании крови определяли содержание общего белка (ОБ), белковых фракций, аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и церулоплазмينا (ЦП). Для определения ОБ сыворотки крови использовали рефрактометрический метод, вычисления проводили по показателю преломления (Кондрахин И.П., 2004). Белковые фракции сыворотки крови определяли турбидиметрическим (нефелометрическим) методом. При этом учитывали не только их относительное содержание, но и белковый индекс – отношение количества альбуминов к количеству глобулинов (А/Г). Активность АСТ и АЛТ определяли по унифицированному методу Райтмана-Френкеля с помощью наборов реагентов АСТ-ВИТАЛ и АЛТ-ВИТАЛ (ООО «Витал Диагностика, СПб) в соответствии с инструкцией. Уровень церулоплазмينا определяли экспресс-методом по Э.В.Тэну (1981).

Для оценки иммунологической реактивности кроликов определяли содержание Т-лимфоцитов в периферической крови в реакции спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-РОК) (Бажин М.А., Мироненко В.А., Переходов С.К., Солодовников В.Л., Пацула Ю.И., 1989; Петров Р.В., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1993) и В-лимфоцитов методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами мыши (Новиков Д.К., Новикова В.И., 1996).

Уровень антител в сыворотке крови определяли, используя оптимизированный метод непрямого ИФА с антигенами, полученными из *M.bovis* Bovinus-8, а также модифицированный мультиплексный иммуноанализ. Для этих целей использовали диагностические гипериммунные сыворотки крови кроликов против *M.bovis* Bovinus-8, полученные ранее (Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Шуралев Э.А., Хаертынов К.С., Ахмадеев Р.М., 2014).

В качестве антигенов для серологических исследований использовали экстракт клеток микобактерий, полученный описанным ранее способом (Пат. 2390559, Валеева А.Р., Хисматуллина Н.А., Цибульский А.П., Гулюкин А.М.,

Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Ахмадеев Р.М., Невзорова Т.А., Хаертынов К.С., Москвичева А.В., Нюхнин М.А., Зыятдинов А.К., 2014) и их вторичные метаболиты, выделенные из супернатанта при экстракции. Электрофорез антигенного материала проводили в 12,5% разделяющем полиакриламидном геле по Laemmli U.K. (1970), как описано ранее (Алфредо Э., Вершинина В.И., Хаертынов К.С., Герасимова С.В., Уразов Н.Г., Хаертынова И.М., 2013). Серологическую активность антигенов изучали в реакции иммуноблот, который ставили по схеме, аналогично описанной ранее (Алфредо Э., Вершинина В.И., Хаертынов К.С., Герасимова С.В., Уразов Н.Г., Хаертынова И.М., 2013), для чего фракционированный материал переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Иммуноблот, как высокоспецифичный и высокочувствительный референтный метод, проводили и для определения специфичности антител в сыворотке крови исследуемых животных к микобактериальным антигенам, сравнивая показания с таковыми, полученными с гипериммунной кроличьей сывороткой крови против *M.bovis* Bovinus-8. Результаты электрофореза и иммуноблота документировали на GelDoc XR+ Sistem (BioRad) и обрабатывали с использованием программного обеспечения «Image Lab Software».

Для постановки ИФА антигены иммобилизовали на поверхности лунок разборного полистиролового 96 луночного планшета (Biomedical LTD). При проведении реакции применяли коммерческие растворы и реагенты: фосфатно-солевой раствор (Phosphate Buffered Saline Tablets, Ampresco) (PBS), в качестве антивидового конъюгата – козы антитела против иммуноглобулинов кролика, меченные пероксидазой (Sigma), для проявления реакции – однокомпонентный субстрат тетраметилбензидина (ТМБ) производства Вектор Corp. Учет результатов ИФА осуществляли на спектрофотометре Multiscan GO (Thermo Scientific) с оценкой абсолютных показателей оптической плотности (ОП) исследуемой и контрольной проб сыворотки крови животных.

Мультиплексный иммуноанализ ставили по описанной ранее методике (Шуралев Э.А., 2012; Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Валеева А.Р., Васин А.А.,

Иванов А.В., Велан К., 2013) в модификации для определения уровня специфических антител у кроликов, для чего в качестве конъюгата использовали указанные выше антитела против иммуноглобулинов кролика. Уровень антител определяли в относительных световых единицах (RLU).

Патоморфологические исследования заключались в определении массового коэффициента печени и селезенки и фотометрии селезенки.

Для гистологических исследований после убоя отбирали следующие внутренние органы модельных животных: печень, почки, легкие, селезенка, надпочечники, региональные лимфатические узлы, локализованные в месте введения гомогенной суспензии живых клеток *M.bovis* Bovinus-8 по стандартной методике. Кусочки органов фиксировали в 4 % растворе параформальдегида на PBS. Затем осуществляли проводку и заливку в парафин по методу Волковой О.В., Елецкого Ю.К. (1982). Гистологический материал окрашивали гематоксилином Гарриса и эозином водным.

Из органов и тканей модельных животных готовили суспензии по методу Гона-Левенштейна-Сумиоши для последующего посева на плотную питательную среду Левенштейна-Йенсена и проведения ПЦР.

Из гомогенизированных суспензий для постановки ПЦР выделяли ДНК с применением набора ДНК-сорб-С (Интерлаб Сервис) в соответствии с инструкцией по применению.

Для идентификации возбудителя проводили ПЦР, используя праймеры и зонды для определения рода *Mycobacterium*, дифференцирования от вакцинного штамма *M.bovis* VCG и выявления соответствия геному патогенных микобактерий туберкулезного комплекса. Соответствующие олигонуклеотидные последовательности представлены в таблице 2.

Идентификацию возбудителя осуществляли в режиме реального времени по общепринятой методике. При постановке реакции использовали компоненты ПЦР-смеси представленные в таблице 3.

Таблица 2 – Праймеры и зонды, использованные для идентификации *M.bovis* методом ПЦР

Наименование	Маркер	Последовательность 5' -> 3'
mycobacterium F	Род	agcggcggagcatgtggat
mycobacterium R	Mycobacterium	cacacaggccacaaggaacg
mycobacterium Z		CY5-cgatgcaacgcgaagaaccttacctggg-BHQ3
BCG F	Mycobacterium bovis BCG (вакцинный штам)	acctgacgacggcgagcagcta
BCG R		aggcgatctggcggttgg
BCG Z		ROX-cgttcgtggtggagcggattga-BHQ2
MTB complex F	Mycobacterium tuberculosis complex (микобактерии туберкулезного комплекса)	acctgacgacggcgagcagcta
MTB complex R		caccacgatcatgtgccaatc
MTB complex Z		R6G-cgttcgtggtggagcggattga-BHQ1

Таблица 3 – Компоненты реакционной смеси для постановки ПЦР

Наименование компонента	Объем, из расчета на одну пробу, мкл
10x ПЦР буфер	1,5
Вода	3,5
MgCl ₂	1,5
Смесь нуклеотидтрифосфатов (дНТФ)	1,5
ДНК-полимераза	0,5
Праймер 1	0,5
Праймер 2	0,5
Зонд	0,5

Образец ДНК вносили в объеме 5 мкл. Режим амплификации включал следующие этапы:

- 95°C – 300 секунд, 1 цикл;
- 95°C – 10 секунд,
- 60°C – 35 секунд, 40 цикл (детекция).

Детекцию продуктов амплификации проводили, используя амплификатор CFX (BioRad). Полученные результаты обрабатывали с помощью программы BioRad CFX Manager.

Изменчивость *M.bovis* Bovinus-8, его культурально-морфологические и биохимические свойства определяли, отслеживая скорость роста бактерий на питательных средах, количество и морфологию колоний, способность бактерий продуцировать ниацин, вырабатывать нитратредуктазу, каталазу и кислую фосфатазу по стандартным методикам в соответствии с приказом № 109 О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации от 21 марта 2003 г. (Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2003). В качестве контроля использовали исходную культуру штамма *M.bovis* Bovinus-8 и референс-штамм *M.tuberculosis* H37Rv, выращенные в стандартных условиях.

Фенотипическую изменчивость возбудителя определяли световой микроскопией (окрашивание по Циль-Нильсену) и сканирующей автоэмиссионной электронной микроскопией (СЭМ) с использованием универсального аналитического комплекса *Merlin* (Carl Zeiss). СЭМ проводили на базе лаборатории Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» КФУ. Предварительно биологические препараты проходили процесс инактивации и дегидратации через градиент спиртов восходящей концентрации. Далее на покровные стекла с фиксированным мазком суспензий микобактерий и высушенными образцами органов наносили токопроводящий слой методом напыления золота-палладия в вакуумной камере Quorum.

Белковый спектр возбудителя изучали методом электрофореза в разделяющем 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим окрашиванием азотнокислым серебром. Клетки разрушали на приборе Fast Prep-24 (MP Biomedicals) с использованием пробирок Blue Matrix Tube (MP Biomedicals).

Наличие кадмия в органах и тканях животных экспериментальных групп определяли атомно-адсорбционным методом на спектрофотометре Analyst-200, подготовку проб осуществляли в соответствии с ГОСТ 30178-96.

Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса и продуктов убоя кроликов при инфицировании *Micobacterium bovis*, хронической интоксикации хлоридом кадмия и их сочетанном воздействии заключалась в органолептическом осмотре тушек и внутренних органов модельных животных, выявлении патологоанатомических изменений, микробиологических и физико-химических исследованиях мяса и продуктов убоя, согласно Правилам ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов. В ходе исследования определяли их соответствие гигиеническим требованиям безопасности (СанПиН 2.3.2.1078-01).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Показатели естественной резистентности организма кроликов, инфицированных *Micobacterium bovis* на фоне хронической интоксикации хлоридом кадмия

3.1.1 Физиологические показатели

Физиологические показатели позволяют охарактеризовать состояние организма и обнаружить отклонения в работе внутренних систем, вызванных различными факторами, как загрязнением окружающей среды, так и воздействием инфекционного характера. В ходе исследования влияние хлорида кадмия на физическое здоровье кроликов оценивали, анализируя количественные параметры веса и температуры тела.

Показатели изменения температуры тела кроликов сгруппировали и вывели среднее значение за 7 сут исследования, представлены в таблице 4. При хронической интоксикации хлоридом кадмия в течении первых 7 сут исследования наблюдали повышение температуры тела (в 1-ой группе до $38,78 \pm 0,39$ °С; в 3-ей группе до $38,70 \pm 0,19$ °С), а при инфекционном процессе – понижение (с $38,28 \pm 0,26$ °С до $38,04 \pm 0,27$ °С во 2-ой группе и с $38,64 \pm 0,21$ °С до $38,08 \pm 0,23$ °С в 3-ей). Далее показатель изменялся волнообразным у животных всех экспериментальных групп и была выше физиологической нормы. Однако температура тела достоверно превышала показатели контрольной группы только у кроликов 1-ой и 3-ей. К концу эксперимента значения достигали уровня $39,00 \pm 0,21$ °С в группе хронической интоксикации, $38,76 \pm 0,15$ °С при инфицировании *M.bovis* и $39,00 \pm 0,37$ °С при их сочетании.

Таблица 4 – Показатели температуры тела кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$, °С (M±m)

Срок исследования, сут		Группы			
		1	2	3	4
интоксикация	инфицирование				
0	-14	38,42±0,34	38,12±0,11	38,20±0,07	38,06±0,21
7	-7	38,78±0,39*	38,02±0,8	38,70±0,19*	38,02±0,08
14	0	38,88±0,11*	38,28±0,26	38,64±0,21	38,06±0,18
21	7	38,62±0,11*	38,04±0,27	38,08±0,23	37,88±0,13
28	14	38,60±0,29	38,20±0,21	38,72±0,29	38,14±0,13
35	21	39,00±0,07*	38,44±0,32	38,74±0,15*	38,08±0,13
42	28	39,04±0,11*	38,54±0,32	38,94±0,34	38,26±0,18
49	35	38,86±0,17*	38,42±0,36	39,08±0,31*	38,12±0,11
60	46	39,00±0,21*	38,76±0,15	39,00±0,37*	38,02±0,25

Примечание: * $p \leq 0,05$ относительно показателя контрольной группы

При анализе показателей массы тела в группе интактных животных выявлен постоянный последовательный прирост (табл. 5).

Таблица 5 – Живая масса кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$, кг (M±m)

Срок исследования, сут		Живая масса			
		Группа			
интоксикация	инфицирование	1	2	3	4
0	-14	3,368±0,297	3,218±0,309	3,357±0,134	3,104±0,079
7	-7	3,259±0,263	3,403±0,024	3,265±0,355	3,477±0,007
14	0	3,457±0,283	3,435±0,068	3,386±0,414	3,618±0,004
21	7	3,470±0,414	3,334±0,226	3,359±0,401	3,624±0,074
28	14	3,487±0,402	3,396±0,283	3,338±0,260	3,746±0,045
35	21	3,488±0,260	3,468±0,354	3,416±0,277	3,824±0,156
42	28	3,500±0,277	3,610±0,226	3,414±0,229	3,845±0,199
49	35	3,524±0,229	3,576±0,263	3,418±0,293	3,847±0,163
60	46	3,563±0,293	3,634±0,204	3,443±0,349	3,937±0,216

Динамика изменения массы тела животных 1-ой, 2-ой и 3-ей групп характеризовалась сменой набора и потери веса. К концу эксперимента (42 сут) в 1-ой группе абсолютный прирост живой массы составил 195 г (6 %), во 2-ой – 416 г (13 %), в 3-ей – 86 г (3 %), а в контрольной группе 833 г (27 %) (рис. 3).

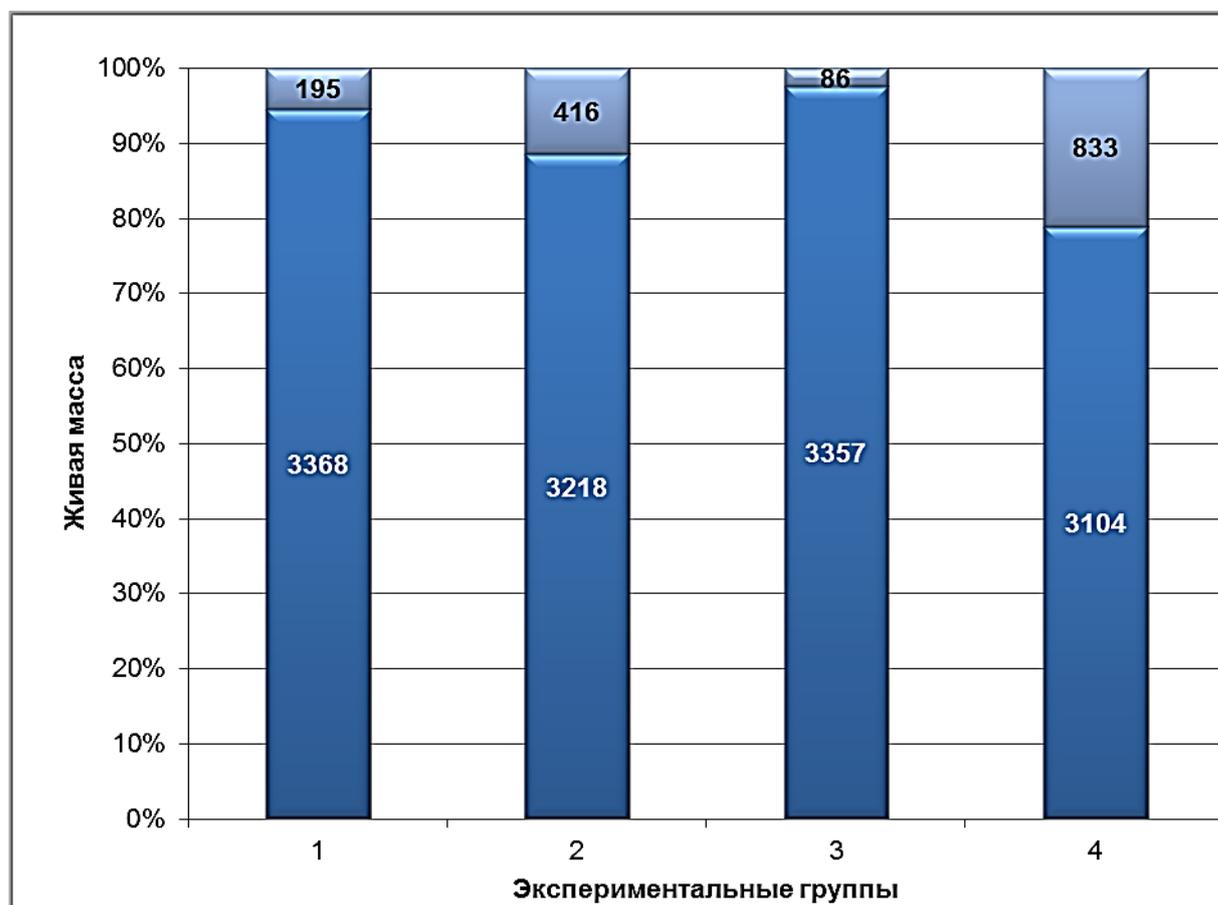


Рисунок 3 – Прирост массы тела кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , г:

- Абсолютный прирост живой массы;
 - Живая масса экспериментальных животных (фон);
- 1 группа (хроническая интоксикация CdCl_2);
 2 группа (инфицирование *M.bovis* Bovinus-8);
 3 группа (инфицирование *M.bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации CdCl_2);
 4 группа (интактные животные)

Установлено, что при инфицировании кроликов микобактериями туберкулеза бычьего типа на фоне хронической интоксикации малыми дозами CdCl_2 наблюдается замедление роста и развития, прирост живой массы составляет 3 % против 6% в группе интоксикации, 13 % в группе инфицирования и 27 % у интактных животных. Изменение показателей теплового состояния организма животных всех экспериментальных групп характеризуется волнообразными колебаниями температуры тела, при этом показатель достигал в 1-ой группе $39,04 \pm 0,11^\circ\text{C}$, во 2-ой – $38,76 \pm 0,15^\circ\text{C}$, в 3-ей – $39,08 \pm 0,31^\circ\text{C}$.

Результаты опубликованы в работе «Некоторые физиологические и биохимические показатели кроликов при патогенезе туберкулеза на фоне интоксикации тяжелыми металлами» (Валеева А.Р., Ахмадеев Р.М., Алеева З.З., 2014).

3.1.2 Биохимические показатели

Биохимические показатели сыворотки крови позволяют судить о состоянии обмена веществ и оценить степень влияния хронической интоксикации кадмием и инфицирования *M.bovis* на организм модельных животных. По литературным данным концентрация общего белка в сыворотке крови кроликов при субхронической загрузке CdCl_2 (1,5 мг/кг с кормом) в течении 30 сут снижается, тогда как количество глобулиновых фракций увеличивается (Софронова С.А., 2008). А при экспериментальном заражении коз *M.bovis* уровень ОБ в сыворотке крови коз первоначально увеличивается, а затем к 60 сут эксперимента снижается (Сошникова Е.М., 2016).

Содержание ОБ и белковых фракций в сыворотке крови модельных животных представлены в таблице 6. У интактных животных (4-я группа) средние значения концентрации ОБ, α -, β - и γ -глобулинов на протяжении всего эксперимента оставались в пределах значений физиологической нормы и в среднем по группе варьировали в диапазоне: 6,66 – 7,90 г/дл (ОБ); 0,63 – 0,81 г/дл (α -глобулины); 0,54 – 1,20 г/дл (β -глобулины), 0,73 – 1,37 г/дл (γ -глобулины). Содержание альбуминов находилось на уровне 4,35 – 4,92 г/дл, а глобулинов – 2,09 – 2,69 г/дл. При этом отношение А/Г варьировало в диапазоне 1,68 – 2,38.

Показатели содержания ОБ в сыворотке крови кроликов 1-ой, 2-ой и 3-ей групп находились в пределах физиологической нормы, однако были несколько выше значений 4-ой. При хронической интоксикации уровень ОБ в сыворотке крови кроликов 1 группы изменялся волнообразно, достигая максимального значения на 35 сут эксперимента ($8,87 \pm 2,9$ г/дл) с дальнейшим снижением.

Таблица 6 – Показатели содержания общего белка и белковых фракций в сыворотке крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$, г/дл ($M \pm m$)

Срок, сут.		Группа	Показатель						
интоксикация	инфицирование		общий белок	альбумин	глобулин	глобулиновые фракции			А/Г
						А	β	γ	
0	-14	1	7,04±0,02	4,80±0,17	2,21±0,16	0,44±0,07	0,53±0,03	1,23±0,12	2,17
		2	7,21±0,23	4,29±0,17	2,84±0,05	0,72±0,18	0,61±0,07	1,51±0,06	1,51
		3	7,87±0,07	4,95±0,14	2,86±0,21	0,75±0,12	0,60±0,07	1,49±0,19	1,73
		4	6,77±0,21	4,00±0,11	2,80±0,07	0,88±0,13	0,59±0,09	1,36±0,13	1,43
7	-7	1	7,60±0,78	4,47±0,99	3,14±1,43	0,72±0,13	0,51±0,20	1,90±1,49	1,42
		2	7,32±0,36	3,88±0,31	3,44±0,29*	0,99±0,23	0,65±0,26	1,79±0,65	1,13
		3	8,40±1,80	4,12±1,45	4,29±1,28	1,27±0,40	0,72±0,11	2,30±1,02	0,96
		4	6,93±0,56	4,38±0,12	2,28±0,21	0,64±0,10	0,75±0,17	0,90±0,12	1,92
14	0	1	7,25±0,85	4,53±0,68	2,71±1,33	0,66±0,12	0,52±0,15	1,62±1,26	2,09
		2	7,36±0,44	4,18±0,62	3,19±0,48	0,67±0,18	0,48±0,13	2,04±0,78	1,31
		3	8,02±0,42	4,65±1,27	3,37±0,94	0,93±0,24	0,66±0,24	1,80±1,06	1,38
		4	6,80±0,48	4,35±0,96	2,50±1,14	0,63±0,22	0,78±0,21	1,03±0,45	1,74
21	7	1	7,11±0,28	4,39±0,91	2,73±0,88	0,58±0,29	0,68±0,13	1,47±0,72	1,61
		2	7,36±0,35	4,32±0,51	3,04±0,66	0,93±0,06*	0,42±0,11	1,69±0,74	1,42
		3	8,48±1,33	4,52±0,51	4,05±1,30	0,93±0,50	0,62±0,36	2,40±1,25	1,11
		4	6,83±0,35	4,37±0,42	2,45±0,08	0,63±0,11	0,79±0,14	1,03±0,15	1,78
28	14	1	7,49±0,49	5,00±0,28	2,49±0,77	0,61±0,22	0,55±0,12	1,33±0,59	2,15
		2	7,53±0,39	4,54±0,16	2,99±0,48*	0,76±0,21	0,53±0,20	1,70±0,71	1,51
		3	7,59±0,30	4,87±0,04	2,73±0,04*	0,64±0,04*	0,67±0,01	1,31±0,22	1,78
		4	6,89±0,36	4,70±0,37	2,19±0,03	0,72±0,01	0,54±0,09	0,93±0,11	2,14
35	21	1	8,87±2,90	5,83±2,34	3,05±0,69	0,74±0,13	0,87±0,26	1,44±0,53	1,91
		2	7,98±1,19	4,60±0,57	2,72±0,18*	0,82±0,03	0,79±0,08	1,13±0,08*	1,70
		3	8,14±0,38	5,31±0,63	2,84±0,05*	1,04±0,28	0,66±0,26	1,14±0,06*	1,69
		4	7,06±0,36	4,97±0,48	2,09±0,14	0,63±0,11	0,73±0,15	0,73±0,09	2,38
42	28	1	8,78±2,55	5,74±2,20	3,04±0,44	0,66±0,11*	0,96±0,33	1,43±0,28	1,89
		2	9,50±0,63	5,93±0,69	3,59±0,57	0,99±0,10	0,82±0,30	1,79±0,65	1,65
		3	7,20±0,23	4,42±0,39	2,79±0,16	0,53±0,04*	0,87±0,06	1,39±0,07	1,60
		4	7,36±1,41	4,92±1,10	2,44±0,62	0,87±0,03	1,20±0,03	1,37±0,30	2,02
49	35	1	7,18±0,42	4,96±0,45	2,23±0,02	0,62±0,03	0,63±0,08	0,98±0,04	2,22
		2	7,15±0,30	4,56±0,37	2,58±0,22	0,44±0,34	0,73±0,35	1,31±0,32	1,77
		3	7,32±0,39	4,78±0,70	2,51±0,36	0,60±0,01	0,60±0,08	1,34±0,21	1,90
		4	7,17±0,14	4,67±0,24	2,50±0,16	0,81±0,27	0,73±0,03	0,95±0,12	1,87
60	46	1	7,20±0,16	4,58±0,36	2,62±0,03	0,49±0,01	1,70±0,28	1,07±0,16	1,75
		2	7,40±0,49	4,34±0,22	3,06±0,68	0,88±0,07	0,62±0,06*	1,57±0,61	1,42
		3	7,78±0,51	4,60±0,54	3,18±0,03	0,86±0,06	0,83±0,07	1,49±0,10	1,45
		4	7,20±0,69	4,51±0,20	2,69±0,49	0,76±0,31	0,91±0,15	1,02±0,33	1,68

Примечание: * $p \leq 0,05$ относительно показателя контрольной группы

У животных 2-ой группы максимального значения показатель содержания ОБ достигал на 42 сут эксперимента и превышал уровень 4-ой группы на 29%. К концу эксперимента (60 сут) ОБ во 2-ой группе был равен $7,4 \pm 0,49$ г/дл. Сочетание хронической интоксикации и инфицирования вызывало волнообразное изменение уровня ОБ, а максимальные значения ($8,48 \pm 1,33$ г/дл) отмечены на 7 сут после инфицирования. На 60 сутки уровень ОБ снизился до $7,78 \pm 0,51$ г/дл.

Изменения показателей альбуминовой фракции сыворотки крови в динамике у кроликов 1-ой группы характеризовалась двумя пиками на 14 и 35 сут эксперимента, со значениями $4,53 \pm 0,68$ и $5,83 \pm 2,34$ г/дл соответственно. К 60 сут показатель снижался до значения близкого к показателю 4-ой группы. У животных 3-ей группы наблюдалась сходная картина, однако на 42 сут уровень альбумина резко снизился на 10% ниже показателя 35 сут и к концу эксперимента достигал значения $4,6 \pm 0,54$ г/дл. Альбуминовая фракция сыворотки крови у кроликов 2-ой группы достигала максимального значения на 42 сут эксперимента ($5,93 \pm 0,69$ г/дл) и далее снижалась до $4,34 \pm 0,22$ г/дл.

Белковый индекс (А/Г) в группе интактных животных варьировал в пределах 1,43 – 2,38. В группах экспериментальных животных этот показатель держался в большинстве случаев в пределах нормы. Некоторое понижение А/Г отмечалось во 2-ой и 3-ей группах кроликов, что связано с течением инфекционного процесса.

Динамика изменения показателей глобулиновых фракций в сыворотке крови кроликов характеризовалась тенденцией к снижению. Однако во 2-ой группе наблюдался резкий подъем уровня глобулина на 42 сут эксперимента. В 1-ой и 3-ей группах отмечалось три пика: на 21, 35 и 60 сут.

Уровень α -глобулина в 1-ой группе изменялся волнообразно. Первоначально наблюдался рост до значения $0,72 \pm 0,13$ г/дл на 7 сут, с последующим снижением до $0,58 \pm 0,29$ г/дл на 21 сут эксперимента. Далее наблюдали подъем и на 35 сут α -глобулин в сыворотке крови животных группы хронической интоксикации достигал уровня $0,74 \pm 0,13$ г/дл. К концу эксперимента

(60 сут) значения установились на уровне $0,49 \pm 0,01$ г/дл, что на 36% ниже показателя в группе интактных животных на том же сроке исследования. Динамика изменения концентрации β -глобулина в группе животных, подверженных хронической интоксикации CdCl_2 , характеризовалась двумя пиками – на 21 и 42 сут и общей тенденцией к повышению уровня. К концу эксперимента (60 сут) значение β -глобулина достигало $1,70 \pm 0,28$ против $0,91 \pm 0,15$ г/дл в 4-ой группе. Уровень γ -глобулина на 7 сут исследования достигал значений в два раза выше показателя 4-ой группы. Однако к концу эксперимента снижался и устанавливался на уровне близком к значению γ -глобулина в сыворотке крови интактных животных.

Во 2-ой группе (при инфицировании *M.bovis*) на 21 сут в сыворотке крови выявили повышение уровня α -глобулина до $0,93 \pm 0,06$ г/дл, что на 48 % выше значения 4-ой группы. Далее кривая изменения параметра характеризовалась снижением до $0,76 \pm 0,21$ на 28 сут и подъемом на 42 сут до $0,99 \pm 0,10$ г/дл. К 49 сут уровень α -глобулина сыворотки крови кроликов, инфицированных *M.bovis*, достигал своего минимального значения и был на 46% ниже значения группы интактных животных. К концу эксперимента (60 сут) показатель установился на уровне $0,88 \pm 0,07$ г/дл. Концентрация β -глобулина в сыворотке крови животных 2-ой группы через неделю после инфицирования (21 сут) снизилась на 47% ниже показателя интактных животных. Следующий пик наблюдали на 42 сут, а на 60 сут эксперимента уровень β -глобулина был ниже значения 4-ой группы на 32%. Динамика изменения содержания γ -глобулина во 2-ой группе характеризовалась общей тенденцией к снижению, только с незначительными повышениями на 28 и 42 сут. Минимального значения показатель достигал на 35 сут, $1,14 \pm 0,06$ г/дл, а к концу эксперимента установился на уровне $0,62 \pm 0,06$ г/дл.

Показатели уровня белковых фракций в сыворотке крови животных 3-ей группы, где сочеталось экспериментальное инфицирование *M.bovis* с интоксикация хлоридом кадмия, характеризовались волнообразным изменением α -, β - и γ -глобулинов, до 21 сут эксперимента, аналогично 1-ой группе. В

результате анализа кривых, отражающих содержание α - и β -глобулинов, после инфицирования *M.bovis* выявлена обратная зависимость. При этом динамика изменения содержания α - и β -глобулинов в 3-ей группе была аналогична таковой во 2-ой группе. К концу эксперимента значения этих параметров установились на уровне $0,86\pm 0,06$ и $0,83\pm 0,07$ г/дл соответственно, что превышало значения 4-ой группы на 13% и 9% соответственно. Динамика изменения уровня γ -глобулина характеризовалась резким увеличением концентрации на 21 сут до значения в два раза превышающего показатель интактных кроликов. Далее наблюдалось снижение показателя, и на 35 сут он достигал $1,14\pm 0,06$ г/дл. Однако к концу эксперимента (60 сут) уровень γ -глобулина в сыворотке крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации был на 46% выше значения интактных животных.

В результате исследования содержания общего белка и белковых фракций в сыворотке крови кроликов выявлены изменения, свидетельствующие о нарушении белковообразовательной функции печени, свойственные как токсическому поражению, так и патогенезу туберкулеза.

Оценить повреждения клеточных структур печени позволяет анализ количественных параметров сывороточных ферментов. Действие ТМ на животных проявляется повышением активности аминотрансфераз (Ильязов Р.Г. и др., 2006), активность АЛТ бывает повышена на 17-19%, АСТ – на 13-15% по сравнению с животными референсной группой. Тогда как при экспериментальном заражении коз *M.bovis* уровень АЛТ и АСТ увеличивается к 60 сут эксперимента в 2 раза относительно контроля (Сошникова Е.М., 2016).

При анализе показателей активности сывороточных ферментов подгруппы аминотрансфераз (табл. 7) выявлена корреляция показателей АСТ и АЛТ с хронической интоксикацией и течением инфекционного процесса.

Таблица 7 – Показатели активности ферментов в сыворотке крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$, nkat/л ($M\pm m$)

Срок исследования, сут.		Группа	АСТ	АЛТ	к-т де Ритиса
интоксикация	инфицирование				
0	-14	1	175,58±32,54	432,15±16,51	0,41
		2	125,20±22,07	399,74±48,00	0,31
		3	125,35±25,84	474,76±60,85	0,26
		4	183,66±23,50	425,26±20,23	0,43
7	-7	1	125,69±46,49	322,45±81,18	0,39
		2	120,02±42,07	332,84±48,38	0,36
		3	70,57±4,81*	233,94±26,95	0,30
		4	187,12±33,79	338,82±82,93	0,55
14	0	1	146,20±38,40	334,90±112,59	0,44
		2	155,92±150,41	541,05±418,59	0,29
		3	236,88±216,2	525,61±287,92	0,45
		4	175,37±94,00	381,08±168,00	0,46
21	7	1	115,25±78,69	306,78±121,21	0,38
		2	182,54±68,66	558,17±271,54	0,33
		3	105,94±21,00	419,63±303,23	0,25
		4	174,42±32,45	429,59±126,48	0,41
28	14	1	96,19±32,74	290,11±13,61	0,33
		2	151,59±56,34	425,31±73,82	0,36
		3	85,60±17,33	335,40±187,42	0,26
		4	155,92±48,27	432,31±116,22	0,36
35	21	1	120,58±72,78	343,18±109,15	0,35
		2	233,66±108,49	575,62±248,23	0,41
		3	268,97±34,58	577,70±19,69	0,47
		4	95,02±47,77	374,41±62,35	0,25
42	28	1	119,52±70,24	301,62±109,56	0,40
		2	158,64±10,47	427,47±17,38	0,37
		3	150,78±28,88	358,74±154,42	0,42
		4	172,76±23,51	412,92±60,53	0,42
49	35	1	109,94±40,20	437,92±222,31	0,25
		2	123,36±51,70	408,75±145,26	0,30
		3	136,11±3,42*	374,41±110,33	0,36
		4	52,73±16,36	329,68±80,28	0,16
60	46	1	73,35±26,00	318,23±97,00	0,23
		2	20,12±4,12	312,01±82,57	0,06
		3	77,43±17,33	371,32±4,36	0,21
		4	115,69±112,92	402,5±39,72	0,29

Примечание: * $p\leq 0,05$ относительно показателя контрольной группы

Так при введении CdCl_2 наблюдали волнообразную динамику изменения АСТ с тенденцией к снижению. К концу эксперимента (60 сут) концентрация АСТ в сыворотке крови кроликов 1-ой группы установилась на уровне $73,35 \pm \text{pkat/л}$, что на 37% ниже показателя группы интактных животных. При этом показатель АЛТ при хронической интоксикации повышался и на 49 сут достигал максимального значения $437,92 \pm 222,31 \text{ pkat/л}$, что на 33% выше показателя 4-ой группы. Однако на 60 сут активность данного фермента снижалась и устанавливалась на уровне $318,23 \pm \text{pkat/л}$.

Кривые изменения активности обоих ферментов в сыворотке крови кроликов группы инфицирования характеризовались двумя пиками на 21 и 35 сут исследования и снижением к концу эксперимента. При этом уровень АСТ и АЛТ на 60 сут достигал значений на 83 и 22% ниже параметров 4-ой группы соответственно.

У животных 3-ей группы наблюдалась сходная картина. Однако наибольшие значения АСТ и АЛТ выявлены на 14 и 35 сут исследования. А к концу эксперимента активность ферментов была ниже значений группы интактных животных на 33 и 8% соответственно.

ЦП является как основным медьсодержащим белком крови, так и белком острой фазы воспаления, относящимся к группе альфа-2-глобулины. Снижение уровня ЦП указывает на токсическое поражение, блокирование активных центров и инактивации фермента (Шорникова Н.И., Судакова Н.Н., Конопатов Ю.В., Васильева С.В., 2013). Увеличение – на инфекционные и аутоиммунные заболевания.

Концентрация синтезируемого гепатоцитами ЦП в сыворотке крови кроликов при хронической интоксикации CdCl_2 на 7 сут исследования повышалась и достигала значений, на 50% выше уровня 4-ой группы (Рис. 4).

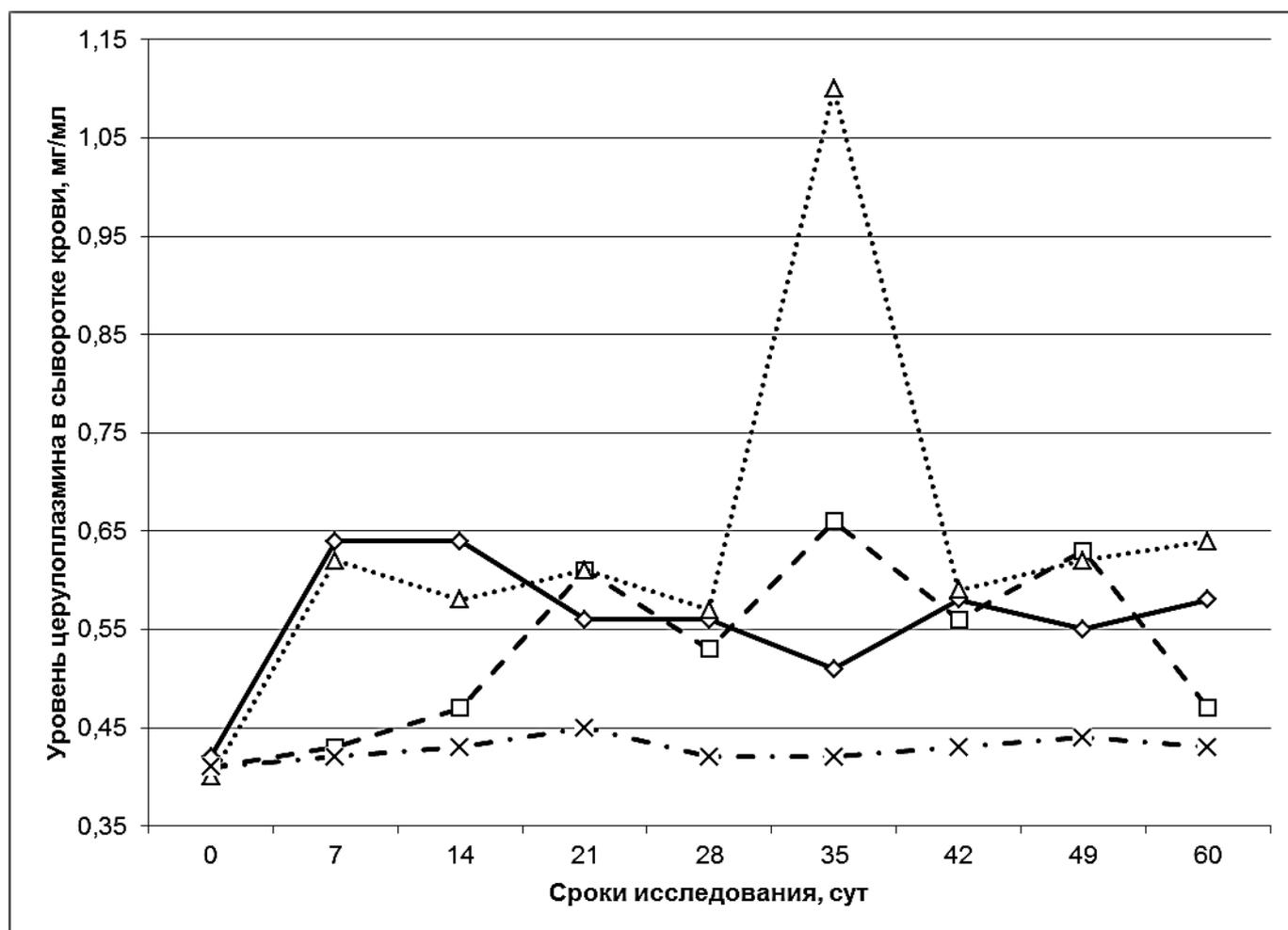


Рисунок 4 – Содержание церулоплазмينا в сыворотке крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl₂, мг/л:

- ◇— 1 группа (хроническая интоксикация CdCl₂);
- 2 группа (инфицирование *M.bovis* Bovinus-8);
- ..△.. 3 группа (инфицирование *M.bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации CdCl₂);
- ×— 4 группа (интактные животные)

Далее в 1-ой группе динамика характеризовалась волнообразным изменением этого параметра с тенденцией к снижению. Уровень ЦП на 60 сут исследования превышал показатель интактных животных на 35%. Снижение показателя свидетельствует о цитолизе клеточных структур печени и нарушении обмена меди и железа.

Во 2-ой и 3-ей группах после инфицирования *M.bovis* кривая динамики изменения ЦП имеет 2 характерных пика на 21 и 35 сут эксперимента. При этом концентрация выше в сыворотке крови кроликов группы инфицирования на фоне хронической интоксикации. Более выраженное отличие наблюдается на 35 сут, $1,10 \pm 0,45$ в 3-ей группе против $0,66 \pm 0,06$ г/л у животных 2-ой. Далее во 2-ой группе наблюдается еще один пик на 49 сут эксперимента, концентрация медьсодержащего белка достигает значения на 43% выше уровня 4-ой группы. В 3-ей группе уровень ЦП на 42 снижается до значения $0,59 \pm 0,01$ г/л. Однако к концу эксперимента (60 сут) достигает уровня $0,64 \pm 0,08$ г/л, что на 49% выше показателя интактных животных.

Таким образом, в ходе эксперимента установлены нарушения белковообразовательной функции печени и изменения активности сывороточных ферментов, свойственные как токсическому поражению, так и патогенезу туберкулеза. Показатели уровня белковых фракций у животных, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической кадмиевой интоксикации, превышали значения контрольной группы на 9-13% (достигая уровня $1,27 \pm 0,40$ г/дл для α - и $0,87 \pm 0,06$ г/дл для β -глобулинов), а динамика изменения уровня γ -глобулина характеризовалась резким увеличением концентрации на 21-е и 35-е сутки до $2,40 \pm 1,25$ г/дл, что в 2 раза превышает показатель интактных кроликов ($p < 0,05$). Наибольшие значения АСТ и АЛТ выявлены на 14 и 35 сут исследования ($268,97 \pm 34,58$ nkat/л и $577,70 \pm 19,69$ nkat/л, соответственно). Уровень ЦП достигал максимальных значений на 35 сут, $1,10 \pm 0,45$ г/л, что превышало показатели остальных групп в 1,5-2 раза ($p < 0,05$).

Результаты опубликованы в статье «Биохимические показатели сыворотки крови кроликов при патогенезе туберкулеза на фоне интоксикации хлоридом кадмия» (Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Валеева А.Р., Ахмадеев Р.М., Алеева З.З., Хаертынов К.С., 2016).

3.1.3 Гематологические показатели

Известно, что токсическое поражение внутренних органов оказывает влияние на показатели гемопоэза, клеточного и гуморального иммунитета (Кривоногова А.С., Исаева А.Г., Баранова А.А., 2013; Ткаченко Е.А., Дерхо М.А., 2015; Жаксылыкова А.К., Ы.А. Аламбаев, Н.Л. Ткаченко, 2014). Введение с рационом кадмия приводит к снижению Т- и В-лимфоцитов (Жоров Г.А., Рубченков П.Н., Обрывин В.Н., 2011).

Т-клеточный иммунитет, как основной инструмент распознавания инфекционного агента и активации макрофагов, является показателем резистентности организма к возбудителям туберкулеза (Верховский О.А., Найманов А.Х., Савицкая О.А., 2006; Салина Т.Ю., Морозова Т.И. 2014). При туберкулезе легких выявлено снижение Т-лимфоцитов (CD3), при этом количество В-клеток увеличивалось (Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Новицкий В.В., Воронкова О.В., Михеева К.О., Игнатов М.В., Филинюк О.В., Новосельцева О.И., Степанова Е.П., 2012).

Лейкоцитарная формула цельной крови животных, получавших плацебо (4 группа) соответствовала физиологической норме для кроликов (табл. 8), однако характеризовалась низкими значениями содержания моноцитов.

После введения $CdCl_2$ у кроликов 1-ой и 3-ей групп наблюдалось нарастание показателя. При этом максимального значения уровень лимфоцитов в крови животных 1-ой группы достигал на 28 сут эксперимента ($62,33 \pm 6,35$ %). Далее кривая динамики изменения относительного количества лимфоцитов в крови кроликов группы хронической интоксикации характеризовалась снижением показателя с последующим ростом к 49 сут ($59,33 \pm 1,53$ %). На 60 сут уровень лимфоцитов в крови кроликов 1-ой группы незначительно превышал показатель 4-ой группы, $55,33 \pm 3,79$ против $54,67 \pm 0,58$ % соответственно.

Таблица 8 – Лейкоцитарная формула крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$ (M±m)

Срок исследования, сут.		Лимфоциты, %	Сегментоядерные нейтрофилы, %	Палочкоядерные нейтрофилы, %	Эозинофильные гранулоциты, %	Базофильные гранулоциты, %	Моноциты, %
интоксикация	инфицирование						
Группа 1 (хроническая интоксикация $CdCl_2$)							
0	-14	54,00±1,00	35,00±1,00	4,00±0,00	2,00±0,00	1,70±0,80	1,67±0,58
7	-7	54,50±0,71	35,50±3,54	6,00±2,83	2,00±1,41	0,50±0,71	1,50±0,71
14	0	55,50±3,54	36,00±4,24	4,00±2,83	2,50±0,71	1,00±1,41	1,00±0,00
21	7	61,30±3,05	32,00±1,70	3,30±1,15	1,30±0,58	1,30±0,58	0,67±0,58
28	14	62,33±6,35	32,33±6,80	2,00±2,00	1,00±1,00	2,00±1,00	0,33±0,58
35	21	53,33±12,66	38,67±10,07	6,67±6,11	1,00±1,00	0,00±0,00	0,33±0,58
42	28	54,33±7,23	33,67±8,62	8,00±2,00	3,33±1,15	0,33±0,58	0,33±0,58
49	35	59,33±1,53	35,00±3,61	5,33±0,60	2,33±1,15	0,67±1,15	0,67±0,58
60	46	55,33±3,79	35,00±3,61	6,67±1,15	2,00±1,00	0,00±0,00	1,00±0,00
Группа 2 (инфицирование <i>M.bovis</i> Bovinus-8)							
0	-14	55,30±2,14	36,00±1,50	3,00±1,00	2,00±0,00	1,70±0,58	1,80±1,00
7	-7	55,50±1,71	32,50±2,89	7,75±1,50	2,50±0,58	0,75±0,50	1,00±0,82
14	0	58,00±2,83	34,50±6,36	4,00±0,50	2,00±1,41	0,50±0,71	1,00±1,41
21	7	59,30±1,15	42,70±6,10	2,00±2,00	0,67±0,58	1,30±0,58	0,67±0,58
28	14	55,00±17,70	39,30±17,50	2,70±2,30	1,00±0,00	2,00±1,00	0,00±0,00
35	21	51,67±1,53	42,67±2,31	3,00±3,61	2,00±1,00	0,00±0,00	0,67±0,58
42	28	55,00±13,11	36,00±14,00	4,67±1,15	2,33±2,31	0,33±0,58	1,67±0,58
49	35	53,00±2,65	39,00±1,00	5,33±3,06	1,33±0,58	0,33±0,58	1,00±0,00
60	46	57,00±2,65	35,67±4,51	8,67±1,53	0,67±1,15	0,33±0,58	1,00±1,73
Группа 3 (инфицирование <i>M.bovis</i> Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$)							
0	-14	53,03±1,03	37,00±1,33	3,00±1,00	2,00±0,00	1,33±0,58	1,00±0,58
7	-7	52,33±1,53	36,33±2,31	8,00±1,00	2,00±0,00	0,33±0,58	1,33±1,53
14	0	55,75±4,03	36,00±5,72	5,50±5,00	2,00±0,00	0,00±0,00	0,75±1,50
21	7	54,70±5,03	42,70±4,16	3,33±2,30	0,33±0,58	1,30±0,58	0,33±0,58
28	14	51,00±7,07	41,50±6,36	3,00±1,40	1,00±1,40	3,00±1,40	0,50±0,70
35	21	59,00±11,36	31,33±11,72	7,67±0,58	1,00±1,00	0,00±0,00	1,00±0,00
42	28	63,50±16,26	32,00±11,31	4,00±5,66	0,67±1,15	0,00±0,00	0,00±0,00
49	35	57,00±9,90	35,00±9,90	5,00±4,24	1,50±2,12	1,00±1,00	0,50±0,71
60	46	62,50±4,95	33,50±0,71	6,00±2,83	2,00±1,00	0,50±0,71	0,50±0,71
Группа 4 (интактные животные)							
0	-14	54,23±3,57	35,33±1,33	3,33±0,89	2,00±0,00	2,00±1,00	1,33±0,58
7	-7	51,00±3,00	36,33±2,08	7,67±0,58	2,67±1,15	1,67±1,15	1,67±1,15
14	0	55,00±1,30	36,00±1,50	3,00±1,00	2,00±0,00	1,70±0,80	1,80±1,00
21	7	55,70±0,58	36,70±2,08	3,33±2,31	2,33±0,58	1,70±0,58	1,30±0,58
28	14	54,00±2,00	39,00±4,36	2,70±3,05	2,33±0,58	1,70±0,58	1,00±0,48
35	21	54,00±3,00	36,33±3,31	5,67±0,58	2,00±1,00	1,00±0,00	1,00±0,22
42	28	52,00±2,65	38,67±3,05	6,00±2,00	2,67±0,58	1,00±0,00	0,67±1,15
49	35	53,00±2,65	33,00±1,73	6,00±2,00	2,00±0,62	1,33±0,58	2,00±0,86
60	46	54,67±0,58	36,67±2,08	7,33±1,53	2,33±0,58	1,33±0,58	0,67±1,15

Примечание: * $p < 0,05$ относительно показателя контрольной группы

В 3-ей группе кривая динамики изменения уровня лимфоцитов в крови была сходна и характеризовалась двумя пиками, однако максимальных значений показатель достигал на 42 и 60 сут эксперимента. Во 2-ой группе после инфицирования (21 сут исследования) наблюдался рост уровня лимфоцитов в крови кроликов. При этом параметр был выше показателя 4-ой группы, $59,30 \pm 1,15$ против $55,70 \pm 0,58$ % соответственно. Далее динамика изменения количества лимфоцитов в крови животных 2-ой группы соответствовала 3-ей и характеризовалась двумя пиками на 42 и 60 сут. При этом уровень лимфоцитов в крови животных 3-ей группы превышал показатель 2-ой.

Резкие колебания и более выраженные пики кривой динамики изменения относительного количества лимфоцитов в периферической крови кроликов характеризуют усиление инфекционного процесса при инфицировании *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$.

В то же время в группах инфицирования наблюдается повышение общего количества нейтрофилов после введения *M.bovis* Bovinus-8. При этом лейкограмма характеризуется сдвигом вправо. Далее нейтрофилия в 3-ей группе сменяется нейтропенией, к 42 сут показатель достигает своего минимального значения. Изменения относительного количества нейтрофилов в цельной крови кроликов 2-ой группы характеризуется волнообразной динамикой с двумя пиками на 21 и 35 сут исследования. Однако к концу эксперимента показатель приближается к значению группы интактных животных.

Кроме того, у кроликов экспериментальных групп выявлена моноцитопения, что является прогностически неблагоприятным синдромом, который может привести к снижению фагоцитарной активности нейтрофилов и естественной резистентности организма.

При анализе результатов исследования иммунологической реактивности (рис. 9) установлено, что в 4-ой группе (интактные животные) количество Т-лимфоцитов варьировало в диапазоне от $50,00 \pm 9,17$ до $62,67 \pm 19,73$ %, а В-лимфоцитов – от $12,25 \pm 2,63$ до $17,00 \pm 1,41$ %.

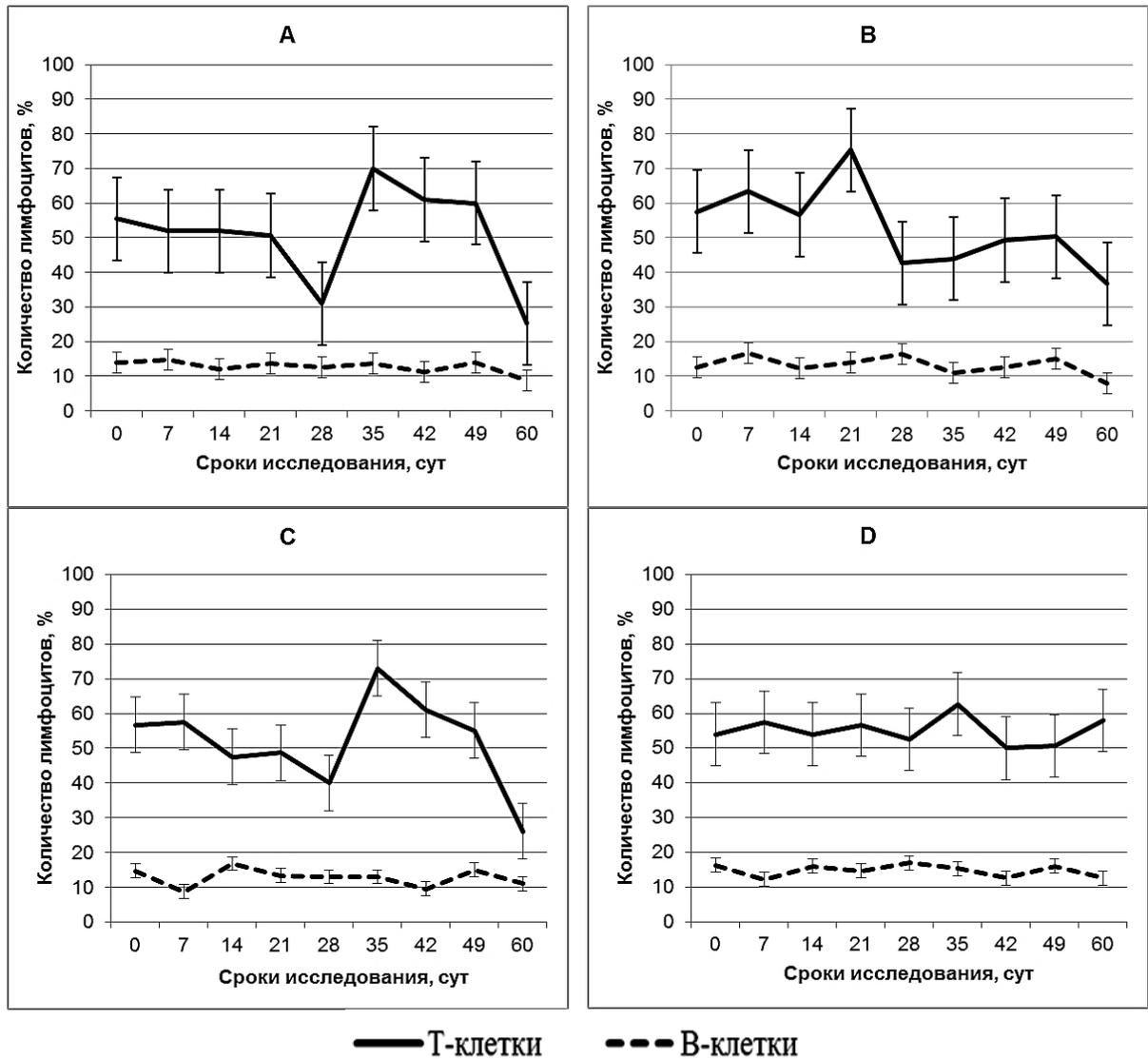


Рисунок 5 – Уровень относительного содержания иммунокомпетентных клеток в крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl₂:

- А** – 1 группа (хроническая интоксикация CdCl₂);
- В** – 2 группа (инфицирование *M.bovis* Bovinus-8);
- С** – 3 группа (инфицирование *M.bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации CdCl₂);
- Д** – 4 группа (интактные животные)

Уровень содержания В-лимфоцитов в крови экспериментальных животных (группы 1, 2 и 3) достоверно не отличался от данных, полученных в группе интактных животных, и варьировал в пределах от $8,00 \pm 2,00$ до $16,75 \pm 2,50$ %. При этом кривая динамики изменения во 2-ой группе имела два пика, на 28 и 49 сут. В 1-ой – три, на 21, 35 и 49 сут. А в 3-ей группе динамика характеризовалась 2 пиками, на 21 и 49 сут исследования.

Выраженные изменения уровня относительного содержания Т-лимфоцитов в динамике развития интоксикации организма и инфекционного процесса отмечены во всех трех экспериментальных группах. Если колебания данного показателя в группе интактных животных не превышали 8 %, то у опытных кроликов они достигали 30 %. Во 2-ой экспериментальной группе выявлено повышение относительного количества Т-лимфоцитов в крови кроликов после инфицирования (14 сут) с дальнейшим снижением. К 60 сут исследования показатель достигал значения $36,67 \pm 21,94$ %.

Хроническая интоксикация хлоридом кадмия (группы 1 и 3) вызывала постепенное снижение относительного числа Т-лимфоцитов к середине эксперимента, с последующим резким его подъемом и повторным снижением. Динамика изменения уровня Т-лимфоцитов в крови животных этих групп характеризовалась первичным снижением, минимального значения показатель достигал к 28 сут исследования. Далее количество Т-клеток увеличивалось, и к 35 суткам достигал значений $70,00 \pm 12,17$ – в 1-ой группе и $73,00 \pm 1,41$ % – в 3-ей. К концу эксперимента (60 сут исследования) этот показатель снижался до $25,33 \pm 6,11$ и $26,00 \pm 8,49$ % соответственно, тогда как в группе интактных животных он составлял $58,00 \pm 10,58$ %.

Усугубление активности Т-клеточного звена иммунитета является неблагоприятным фактором в отношении туберкулеза, где клеточный иммунитет имеет наиболее важное значение. Проведенными исследованиями на кроликах установлено, что интоксикация хлоридом кадмия воздействует на клеточный иммунитет более выражено, чем инфицирование *M.bovis*. Инфекционный процесс

при туберкулезе на фоне кадмиевой интоксикации характеризуется подавлением выработки Т-лимфоцитов, а соответственно и усугублением противотуберкулезного иммунитета.

Хроническая интоксикация хлоридом кадмия вызвала угнетение функциональной активности гуморального иммунного ответа организма кроликов на введение возбудителя туберкулеза. Снижение относительного количества Т- и В-лимфоцитов свидетельствует о низкой сопротивляемости организма, развитии иммунодефицитного состояния и является результатом токсического и инфекционного поражения органов периферической иммунной системы.

Резкие колебания и более выраженные пики кривых изменения показателей лейкоцитарной формулы указывают на тяжесть проходящих в организме кроликов процессов и ослабление неспецифических иммунных реакций при инфицировании *M.bovis* на фоне хронической интоксикации хлоридом кадмия, что проявляется в угнетении функциональной активности В-лимфоцитов и гуморального иммунного ответа, и в подавлении выработки Т-лимфоцитов, с усугублением противотуберкулезного клеточного иммунного ответа. Уровень Т-лимфоцитов в крови животных, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической кадмиевой интоксикации, к концу эксперимента (60 сут исследования) снижался до $26,00 \pm 8,49$ %, тогда как в группе интактных животных он составлял $58,00 \pm 10,58$ %. Уровень содержания В-лимфоцитов в крови опытных животных достоверно не отличался от данных, полученных в группе интактных животных, и варьировал в пределах от $8,00 \pm 2,00$ до $16,75 \pm 2,50$ %.

Результаты гематологических исследований опубликованы в статье «Гематологические показатели кроликов при туберкулезе и кадмиевой интоксикации» (Валеева А.Р., 2016).

3.2 Специфический иммунный ответ кроликов при экспериментальном инфицировании *Micobacterium bovis* и влияние хлорида кадмия на антителогенез

3.2.1 Оптимизация метода непрямого иммуноферментного анализа для оценки гуморального иммунного ответа

Высокой чувствительностью и специфичностью обладают иммунологические методы диагностики туберкулеза разных видов животных и человека (Якупов Т.Р., Хаертдинов К.С., 2011; Шуралев Э.А., Ндайишимийе Э.В., Мукминов М.Н., 2012; Алфредо Э., Вершинина В.И., Хаертынов К.С., Герасимова С.В., Уразов Н.Г., Хаертынова И.М., 2013). При оптимизации условий и режимов постановки непрямого ИФА для изучения показателей специфичного иммунного ответа у кроликов при инфицировании *M.bovis* Bovinus-8 использовали сыворотки крови, иммунизированных антигенным (АГ) материалом животных.

Активность иммунных сывороток оказывает существенное влияние на результат серологических реакций. Уровень специфических антител (АТ) зависит от множества факторов: качества и количества вводимого АГ, способа и кратности введения, применения вспомогательных веществ (Алиева Е.В., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Лаврешин М.П., Афанасьев Н.Е., Горобец Е.А., Семирчева А.А., Миронова А.Ю., 2008; Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Шуралев Э.А., Хаертынов К.С., Ахмадеев Р.М., 2014). Подбор адекватной схемы иммунизации позволяет в короткие сроки получить сыворотки с высоким титром АТ. Иммунный ответ на каждый индивидуальный антиген специфичен. При этом прослеживается зависимость антителогенеза от дозы вводимого АГ, кратности и способа введения.

Для получения высокоактивных и специфичных сывороток против *M.bovis* Bovinus-8 применяли следующую схему иммунизации. Кроликов массой 2,5-3 кг иммунизировали внутрикожно многоточечно вдоль спины (по 5 точек с каждой стороны). В каждую точку вводили по 0,1 мл подготовленного антигенного материала. Через 8 недель после первого цикла проводили повторную иммунизацию. В нижнюю треть шеи с обеих сторон подкожно вводили по 0,5 мл подготовленного тем же способом антигенного материала. На 10 сут после от второй иммунизации осуществляли тотальный забор крови с последующим отделением сыворотки крови.

Суспензию разрушенных клеток микобактерий смешивали с неполным адьювантом Фрейнда (Inject[®] Freund's Incomplete Adjuvant, Thermo Scientific) из расчета: 0,5 мл концентрированной суспензии клеток микобактерий, содержащей 10 ЕД микробных тел/мл, 1 мл стерильного ФР и 1,5 мл адьюванта.

В местах введения культуры клеток наблюдали инфекционную воспалительную реакцию. При внутрикожной иммунизации в местах введения образовывался инфильтрат, отек, гиперемия с центральной зоной ишемии, далее переходящей в некроз. Через 7 недель специфической реакции не наблюдалось. Результаты представлены на рисунке 6. При подкожном введении увеличивались регионарные лимфатические узлы.

Антителогенез и качество гипериммунных сывороток контролировали, определяя образование АТ в сыворотке крови методами иммуноблота и непрямого ИФА с применением исходного антигенного материала и специфичного антивидового конъюгата в рекомендуемом рабочем разведении. Активность сывороток крови кроликов, иммунизированных *M.bovis* Bovinus-8, варьировала в ИФА от 1:400 до 1:128000.

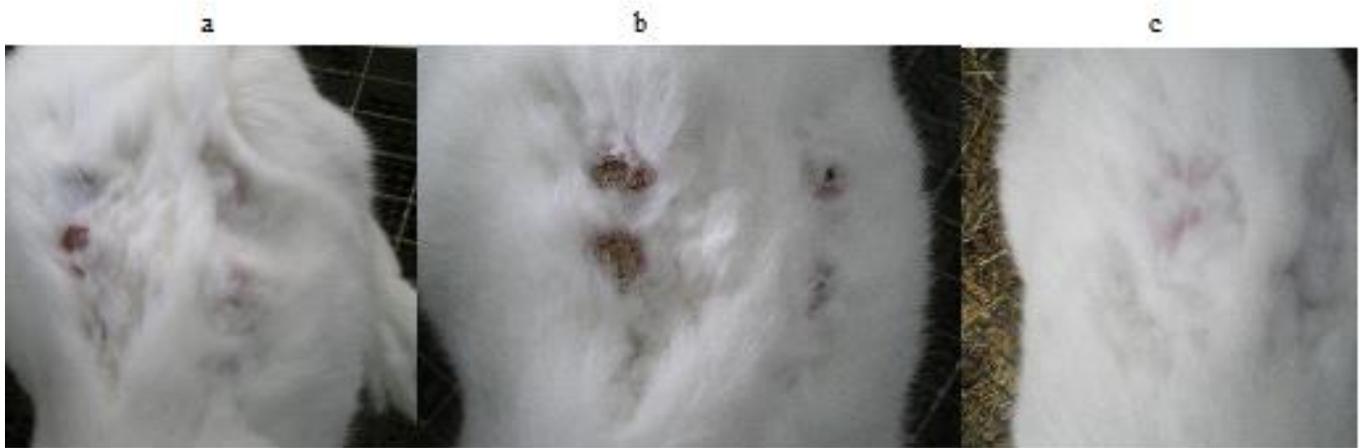


Рисунок 6 – Местная реакция кроликов на введение иммуногенного материала при гипериммунизации суспензией клеток *M.bovis* Bovinus-8:

- a** – 1 неделя после введения;
- b** – 2 неделя после введения;
- c** – 7 недель после введения

Гетерогенный характер специфического иммунного ответа при туберкулезе требует применения для серодиагностики комплекса антигенных компонентов (Lyashchtnco K.P., Sing M., Colangeli R., Genaro M.L., 2000). В качестве антигенного материала для получения гипериммунных сывороток и серологических исследований использовали экстракт клеток микобактерий и их вторичные метаболиты, выделенные из супернатанта при экстракции. Полученную суспензию экстракта клеток гомогенизировали на приборе Fast Prep-24 в режиме 2×45s с применением специальных пробирок Lysing Matrix B.

При анализе электрофоретического фракционирования экстракта клеток *M.bovis* Bovinus-8 и их вторичных метаболитов был выявлен широкий спектр структурных компонентов, распределяющийся в диапазоне молекулярных масс от 200 до 6,5 кДа для первого антигена и от 200 до 16,1 кДа для второго (рис. 7).

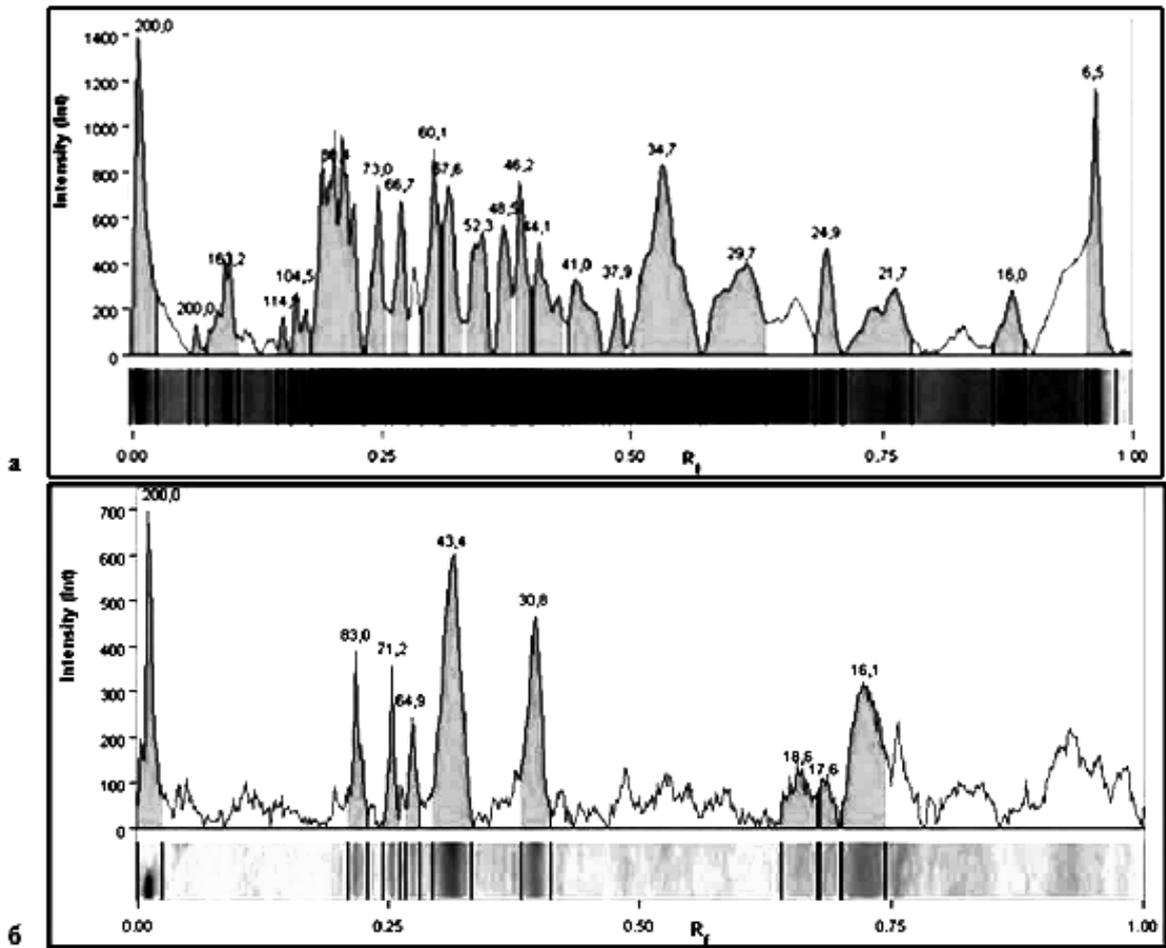


Рисунок 7 – Денситограмма электрофореза антигенного материала из экстракта клеток и вторичных метаболитов *M.bovis Bovinus-8* в 12,5%-ном полиакриламидном геле, окрашивание азотнокислым серебром:

а – экстракт клеток *M.bovis Bovinus-8*;

б – вторичные метаболиты клеток *M.bovis Bovinus-8*

Серологическую активность антигенного материала определяли в реакции иммуноблот с гипериммунной сывороткой кролика против *M.bovis* (рис. 8). При анализе результатов реакции выявили несовпадение с результатами аналитического электрофореза. С положительной сывороткой реагировали фракции антигена, полученного из вторичных метаболитов *M.bovis Bovinus-8*, с молекулярными массами 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа, а антигенный материал из экстракта клеток был активен в зоне от 82,3 до 6,5 кДа. Это позволяет предположить, что, по всей видимости, серологическая активность дислоцирована

не в белковых, а в липидных структурах, что связано с особенностями строения клеточной стенки микобактерий. Однако спектр полученных препаратов охватывает комплекс диагностически значимых антигенов, что исключает получение ложноотрицательных результатов. Полученный антигенный материал использовали в дальнейших серологических исследованиях.

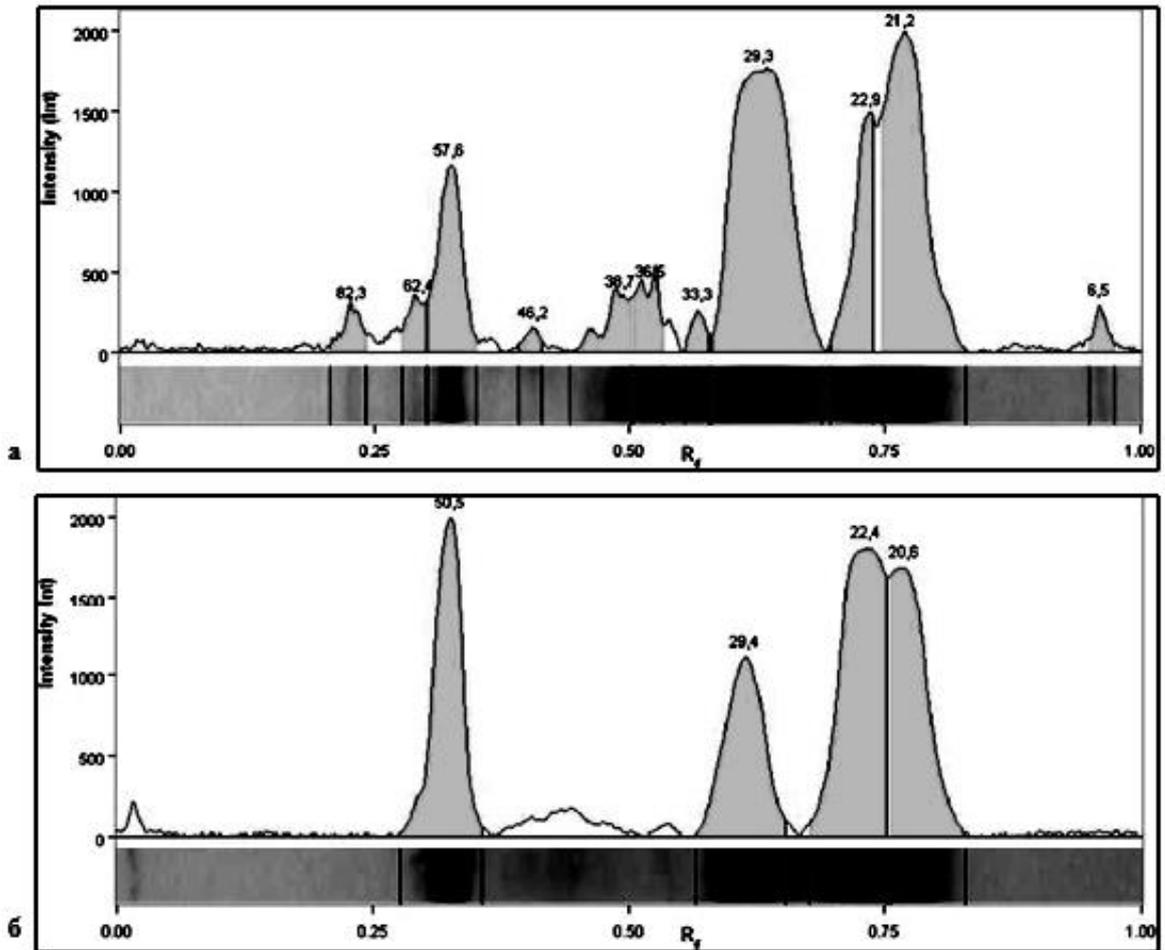


Рисунок 8 – Денситограмма иммуноблота антигенного материала из экстракта клеток и вторичных метаболитов *M.bovis* Bovinus-8 с гипериммунной кроличьей сывороткой крови против клеток *M.bovis*:

а – экстракт клеток *M.bovis* Bovinus-8;

б – вторичные метаболиты клеток *M.bovis* Bovinus-8

При оптимизации условий и режимов постановки непрямого ИФА для изучения показателей специфического иммунного ответа у кроликов

инфицированных *M.bovis* Bovinus-8, с использованием гипериммунных сывороток, выявлено оптимальное для постановки реакции разведение антигенного материала, при котором достигается минимальное значение фона реакции – 1:100 на 0,2М карбонатно-бикарбонатном буферном растворе с рН 9,6.

Установлено, что для более эффективной иммобилизации антигена в лунках полистиролового планшета его необходимо было инкубировать при комнатной температуре в течение 24 часов с дальнейшей 3-кратной промывкой раствором PBS. При этом наиболее приемлемым для постановки ИФА разведением исследуемых сывороток являлось 1:100 в 0,1М фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,2-7,4 с добавлением 0,5% Твина-80 (ФБР-Т) с режимом инкубации – 40 мин при 300 об/мин и температуре 37°C с последующей 5-кратной промывкой ФБР-Т. При этом условия инкубирования и отмывки были оптимальны и на этапе внесения антивидового конъюгата, который применяли в рабочем разведении 1:60000 на ФБР-Т. Для проявления реакции в лунки планшета вносилась субстратная смесь ТМБ, инкубация проходила при комнатной температуре в течение 10 мин. Для остановки реакции использовали 1М раствор серной кислоты.

Наилучшее считывание результатов реакции при фотометрическом измерении наблюдали при длине волны 450 нм и референсном фильтре со значением 655 нм. При таких условиях и режимах постановки ИФА с гипериммунной сывороткой оптическая плотность достигала 3,203 ОЕ при использовании в качестве антигена вторичных клеточных метаболитов и была выше 3,500 ОЕ при использовании экстракта клеток.

Таким образом, в ходе исследования проведена оптимизация постановки ИФА с использованием полученного антигенного материала, вторичных клеточных метаболитов и экстракта клеток *Micobacterium bovis* с использованием гипериммунной кроличьей сыворотки. Получены антигены из экстракта клеток с широким спектром структурных компонентов, распределяющимся в диапазоне молекулярных масс от 200 до 6,5 кДа, и вторичных метаболитов микобактерий

M.bovis с диапазоном от 200 до 16,1 кДа. Установлено, что спектр полученных препаратов охватывает комплекс диагностически значимых антигенов, что исключает получение ложноотрицательных результатов при оценке специфического гуморального иммунитета при туберкулезе. С положительной сывороткой реагировали фракции антигена, полученного из вторичных метаболитов *M.bovis* Bovinus-8, с молекулярными массами 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа, а антигенный материал из экстракта клеток был активен в зоне от 82,3 до 6,5 кДа.

Разработаны оптимальные условия и режимы постановки ИФА с использованием вторичных клеточных метаболитов и экстракта клеток *M.bovis*. При постановке ИФА с гипериммунной сывороткой кролика оптическая плотность достигала 3,203 ОЕ при использовании в качестве антигена вторичных клеточных метаболитов и была выше 3,500 ОЕ при использовании экстракта клеток.

Некоторые результаты опубликованы в статье «Культурально-морфологическая и электрофоретическая характеристика различных микобактерий» (Валеева А.Р., Хаертынов К.С., Шуралев Э.А., Гулюкин А.М., Хисматуллина Н.А., Мукминов М.Н., Ахмадеев Р.М., 2013).

3.2.2 Оценка специфического иммунитета при патогенезе туберкулеза на фоне интоксикации хлоридом кадмия

В результате ИФА выявили, что в группе животных, зараженных *M.bovis* (2 группа), антителогенез проявлялся, начиная с 14-28 сут после инфицирования (табл. 9). Оптическая плотность 5-7-кратно превышала показатели животных до инфицирования и интактных при использовании в качестве антигена экстракта клеток и не более чем в 4 раза при использовании вторичных метаболитов клеток *M.bovis* Bovinus-8. При этом уровень антител в сыворотке крови был стабилен до 46 сут исследования (до конца срока наблюдения) и оптическая плотность достигала 1,177 ОЕ для экстракта клеток и 0,238 ОЕ для вторичных метаболитов.

В 3-ей группе кроликов, инфицированных на фоне интоксикации, специфические антитела обнаруживались только на 28-46 сут после инфицирования. При этом значения оптической плотности превышали показатели у данных животных до инфицирования не более чем в 3 раза и достигали 0,947 и 0,221 ОЕ для указанных антигенов соответственно. Показатели оптической плотности у животных 1-ой и 4-ой групп во все сроки исследования находились на уровне 0,111-0,179 ОЕ для экстракта клеток *M.bovis* Bovinus-8 и 0,055-0,078 ОЕ для их вторичных метаболитов, что являлось общим фоном реакции.

Таким образом, хроническая интоксикация малыми дозами CdCl_2 вызвала угнетение специфического иммунного ответа организма кроликов на введение заражающей дозы возбудителя туберкулеза, что проявлялось в более поздних сроках начала антителогенеза и низком уровне антител в сыворотке крови животных, инфицированных на фоне интоксикации.

Таблица 9 – Уровень специфических туберкулезных антител в сыворотке крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$, в ИФА, ОЕ

Группа	№ животного	Антиген	Срок исследования, сут после инфицирования					
			0	7	14	21	28	46
инфицирование <i>M.bovis</i> Bovinus-8	1	экстракт клеток	0,277	0,268	0,284	0,298	0,381	0,427
		вторичные метаболиты	0,103	0,144	0,162	0,188	0,204	0,238
	2	экстракт клеток	0,101	0,136	0,777	0,668	1,212	1,177
		вторичные метаболиты	0,051	0,054	0,264	0,171	0,254	0,213
	3	экстракт клеток	0,247	0,233	0,402	0,905	0,756	0,543
		вторичные метаболиты	0,034	0,017	0,028	0,139	0,112	0,057
инфицирование <i>M.bovis</i> Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$	4	экстракт клеток	0,125	0,139	0,128	0,182	0,318	0,367
		вторичные метаболиты	0,046	0,055	0,052	0,056	0,076	0,062
	5	экстракт клеток	0,159	0,120	0,143	0,308	0,304	0,947
		вторичные метаболиты	0,057	0,045	0,048	0,079	0,138	0,221
	6	экстракт клеток	0,130	0,128	0,177	0,245	0,366	0,484
		вторичные метаболиты	0,047	0,040	0,056	0,060	0,149	0,165
интактные животные	7	экстракт клеток	0,122	0,168	0,152	0,149	0,180	0,135
		вторичные метаболиты	0,061	0,065	0,062	0,052	0,069	0,055
	8	экстракт клеток	0,137	0,106	0,131	0,133	0,154	0,170
		вторичные метаболиты	0,060	0,063	0,055	0,066	0,067	0,075
	9	экстракт клеток	0,179	0,192	0,115	0,111	0,167	0,120
		вторичные метаболиты	0,071	0,077	0,078	0,069	0,066	0,059

Далее с сыворотками крови животных проводили иммуноблот и определяли молекулярную массу фракций антигенных препаратов, реагирующих с ними. Высокой серологической активностью обладали фракции,

локализованные в низкомолекулярной зоне – 31-24 кДа (рис. 9), тогда как гипериммунная сыворотка реагировала с фракциями в диапазоне от 82,3 до 6,5 кДа.

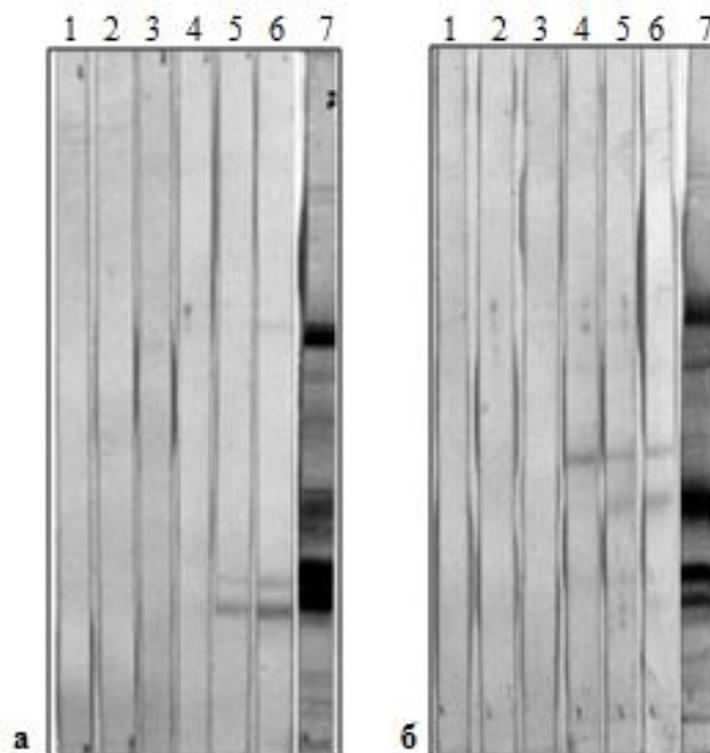


Рисунок 9 – Иммуноблот с сывороткой крови кролика, инфицированного *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , в динамике инфекционного процесса:

а – экстракт клеток *M.bovis* Bovinus-8,

б – вторичные метаболиты клеток *M.bovis* Bovinus-8;

1 – 0, 2 – 7, 3 – 14, 4 – 21, 5 – 28, 6 – 46 сут после инфицирования, 7 – гипериммунная сыворотка кролика против *M.bovis* Bovinus-8

По-видимому, образование связей в реакции антиген-антитело специфичных иммунных компонентов исследуемых сывороток крови кроликов с низкомолекулярными фракциями связано с особенностями иммунного ответа у животных, подвергнутых экспериментальному инфицированию *M.bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации CdCl_2 . Полученные результаты указывают на необходимость проведения дальнейших исследований по препаративному

выделению данных специфических компонентов и изучению их серологической значимости.

При анализе результатов мультиплексного иммуноанализа было установлено, что гипериммунизация кроликов вызывает активизацию антителогенеза к антигенам MPB70 и MPB83 уже после первого введения микобактериальных антигенов, полученных из *M.bovis*. При этом максимальный уровень антител к указанным антигенам достигал более 60000 RLU спустя 21сут после иммунизации и держался на этом уровне до конца срока наблюдения (140 сут). Антителообразование к ранним секретируемым антигенам ESAT-6 и CFP-10 активизировалось после каждого введения микобактериальных антигенов, а максимальный уровень антител (до 50000 RLU) отмечался через 14 сут после 4-й иммунизации.

При инфицировании *M.bovis* образование специфических антител к MPB70 у кроликов 2-ой группы начиналось с 7-х сут, достигая максимальных значений (более 50000 RLU) на 21-42сут. Антитела к антигенам MPB83, ESAT-6 и CFP-10 у животных этой группы выявлялись на более низком уровне и не превышали 10000 RLU во все сроки исследования. Выраженное угнетение антителогенеза отмечалось в группе животных, инфицированных на фоне кадмиевой интоксикации (3-я группа). Антитела к ранним секретируемым антигенам улавливались на уровне менее 3000 RLU, а к MPB-83 – менее 1000 RLU. Максимальные значения уровня антител к MPB70 не превышали 9000 RLU даже спустя 46 сут после инфицирования. У всех кроликов 1-ой и 4-ой групп, которым инфекционный материал не вводился, антитела к указанным антигенам не выявлялись, а показатели мультиплексного иммуноанализа не превышали средний фоновый уровень – 500 RLU.

Серологическими исследованиями установлено, что интоксикация хлоридом кадмия приводит к угнетению выработки специфических антител у кроликов при инфицировании *M.bovis*. Значения оптической плотности в ИФА достигали 0,947 и 0,221 ОЕ для указанных антигенов соответственно. Задержка в

иммунном ответе составляла до 28-46 суток, при этом иммуноблотом выявлены антитела только к антигенным фракциям, локализованным в низкомолекулярной зоне.

Результаты исследований влияния хлорида кадмия на специфический иммунный ответ при патогенезе туберкулеза опубликованы в статье «Влияние интоксикации кадмием на антителогенез кроликов при экспериментальном инфицировании *Micobacterium bovis*» (Валеева А.Р., 2016).

3.3 Постмортальные исследования внутренних органов и тканей кроликов, инфицированных *Micobacterium bovis* на фоне хронической интоксикации кадмием

3.3.1 Патоморфологические и гистологические исследования

Наиболее полное представление о воздействии тяжелых металлов на внутренние органы животных дают патоморфологические исследования органов мишеней того или иного ксенобиотика. Структурно-функциональное состояние органов и тканей животных отражает воздействия окружающей среды на метаболизм, здоровье животных и их продуктивность (Ежкова А.М., Яппаров А.Х., Ежкова М.С. 2011). Морфофункциональные изменения селезенки и полиморфность органа отражают функциональные процессы и иммунитета животного (Завалеева С.М., Садыкова Н.Н., Чиркова Е.Н., 2011). Установлено увеличение печени, селезенки и мезентеральных лимфатических узлов при экспериментальном инфицировании кроликов и мышей *M.avium subsp. paratuberculosis* (Завгородский А.И., Позмогова С.А., Гирка М.А., Шутченко П.А., Медведь Е.А., 2014). Патоморфологические нарушения внутренних органов кроликов, в частности почек и печени наблюдались и при интоксикации $CdCl_2$ (1/20 ЛД₅₀) (Вафин И.Ф., 2010).

Печень кроликов экспериментальных групп отличалась от печени кроликов контрольной цветом, окрас варьировал от яркого красно-коричневого до коричневого, встречались неоднородное окрашивание и мелкие очаги измененной ткани, и формой, увеличивался объем органа, округлялись края (рис. 10). При этом наблюдалось увеличение печени в 1-ой, 2-ой и 3-ей экспериментальных группах по показателю массового коэффициента относительно контрольной на 25, 28 и 26 % соответственно (табл. 10).

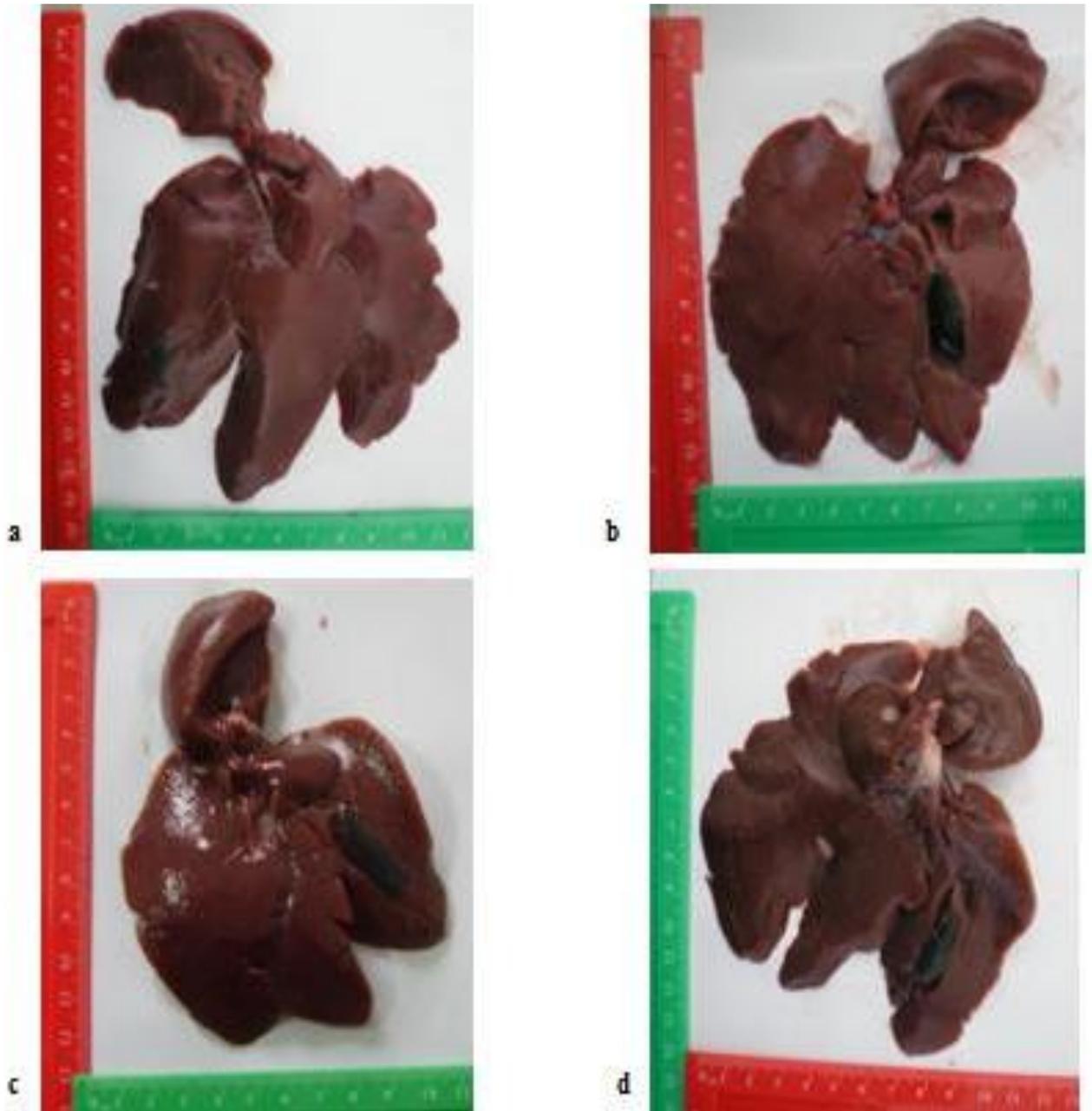


Рисунок 10 – Патоморфологические изменения печени кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$:

- a** – 1 группа (хроническая интоксикация $CdCl_2$);
- b** – 2 группа (инфицирование *M. bovis* Bovinus-8);
- c** – 3 группа (инфицирование *M. bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$);
- d** – 4 группа (интактные животные)

Таблица 10 – Абсолютная и относительная масса печени кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl₂, г (M±m)

Группа	Показатель		
	общая масса тела	абсолютная масса печени	относительная масса печени, %
1	3563±301	87,08±1,31	2,33±0,14*
2	3634±203	83,59±8,04	2,39±0,23
3	3443±349	81,22±0,35	2,35 ±0,22
4	3937±216	76,2±2,10	1,86±0,10

Примечание: * p≤0,05 относительно показателя контрольной группы

Селезенка кроликов всех экспериментальных групп была увеличена, имела неправильную форму с латеральными и дорсальными отростками и бурым окрасом (рис. 11). Массовый коэффициент селезенки был выше на 78% в 1-ой, 2-ой группах и в 2 раза при сочетании хронической интоксикации и инфицирования (3-я группа) (табл. 11).

Таблица 11 – Абсолютная и относительная масса селезенки кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl₂, г (M±m)

Группа	Показатель		
	общая масса тела	абсолютная масса селезенки	относительная масса селезенки, %
1	3563±301	2,01±0,55	0,05±0,02
2	3634±203	1,89±1,50	0,05±0,04
3	3443±349	2,06±0,64	0,06±0,03
4	3937±216	1,10±0,10	0,03±0,01

Примечание: * p≤0,05 относительно показателя контрольной группы

При фотометрии выявили наибольшее патоморфологическое изменение селезенки у особей 3-ей группы (табл. 12). Так у кроликов подвергавшихся хронической интоксикации CdCl₂ и заражению *M.bovis* соотношение длины селезенки к ширине составило 19,32 %, тогда как в 1-ой, 2-ой и контрольной группах 18,2%, 16,52% и 14,4 % соответственно.

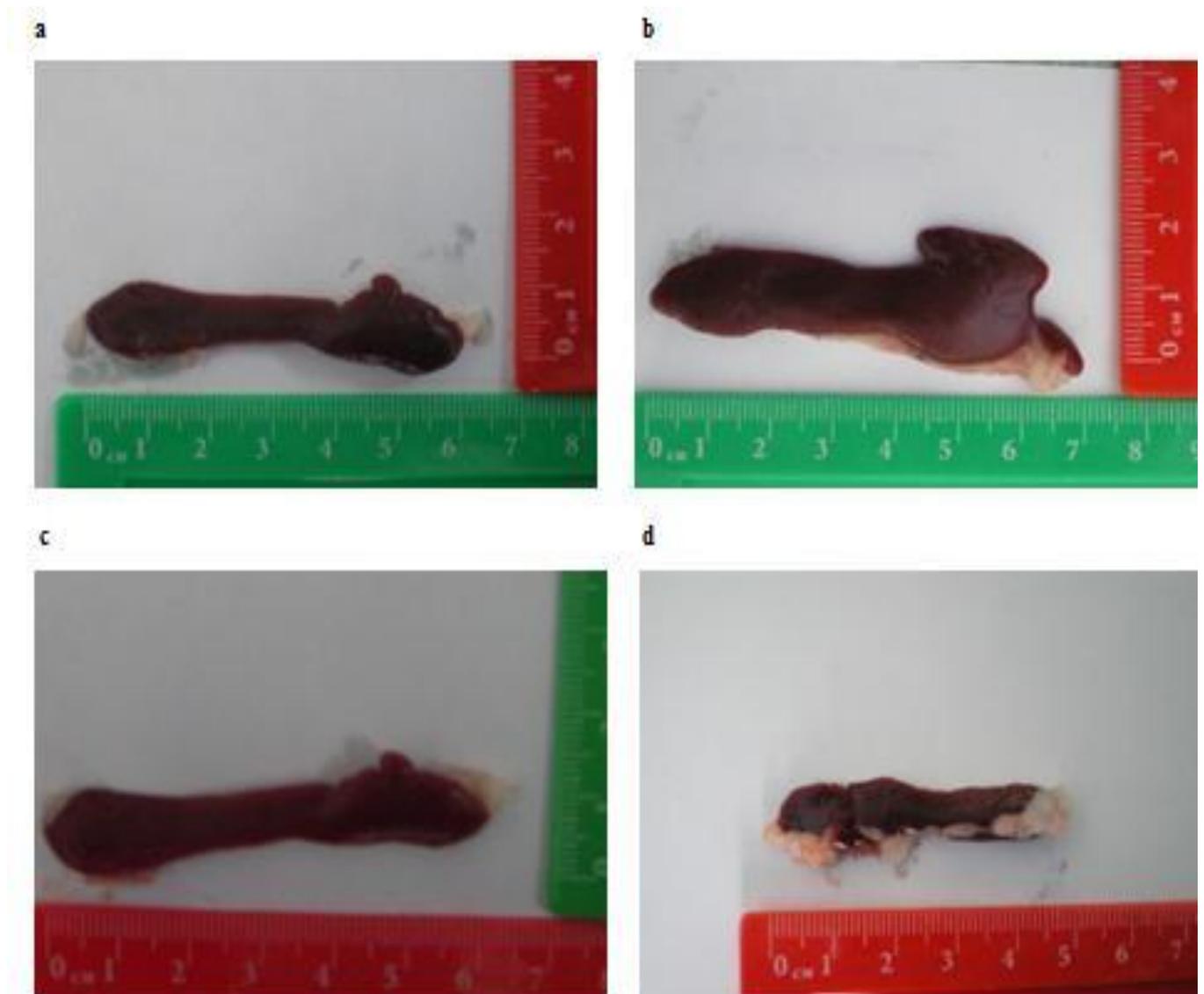


Рисунок 11 – Патоморфологические изменения селезенки кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 :

- a** – 1 группа (хроническая интоксикация CdCl_2);
- b** – 2 группа (инфицирование *M. bovis* Bovinus-8);
- c** – 3 группа (инфицирование *M. bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации CdCl_2);
- d** – 4 группа (интактные животные)

Таблица 12 – Фотометрия селезенки кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$, мм ($M\pm m$)

Группа	Показатели		
	длина	ширина	соотношение длины к ширине, %
1	63,00±6,24	12,00±2,82	18,20±2,54
2	59,00±1,41	9,50±0,71	16,52±0,22*
3	56,33±13,05	11,33±5,85	19,32±5,53
4	55,50±1,05	8,00±0,52	14,40±0,23

Примечание: * $p \leq 0,05$ относительно показателя контрольной группы

При исследовании гистологических препаратов кроликов экспериментальных групп были выявлены некоторые изменения гистоструктур внутренних органов. Так в печени животных группы хронической интоксикации (1 группа), получавших в течение 60 дней $CdCl_2$ обнаружены нарушения балочного строения не резко выраженное на некоторых участках и полное стирание на других (рис. 12). Центролобулярные вены были неравномерно расширены, заполнены гомогенными эозинофильными массами и единичными лейкоцитами, лимфоцитами. Их стенки имели нечеткую структуру с участками истончения. Гепатоциты, расположенные в центре долек, имели нечеткое строение со слабо выраженными контурами. Некоторые были бесформенные в виде глыбок, ядра в них не определялись. Так же были обнаружены участки с гомогенизированными эозинофильно окрашенными безъядерными гепатоцитами, скопления круглоядерных клеток. Синусоиды были расширены, в них можно было увидеть эозинофильные скопления.

У кроликов 2-ой группы в печени изменения варьировали от набухания гепатоцитов, до частичного нарушения балочного строения, центролобулярных, определялись гепатоциты со светлой мутной цитоплазмой, без ядер с нечеткими контурами. У всех животных наблюдали расширение синусоидальных пространств в печени, которые содержали эозинофильные светлые массы.

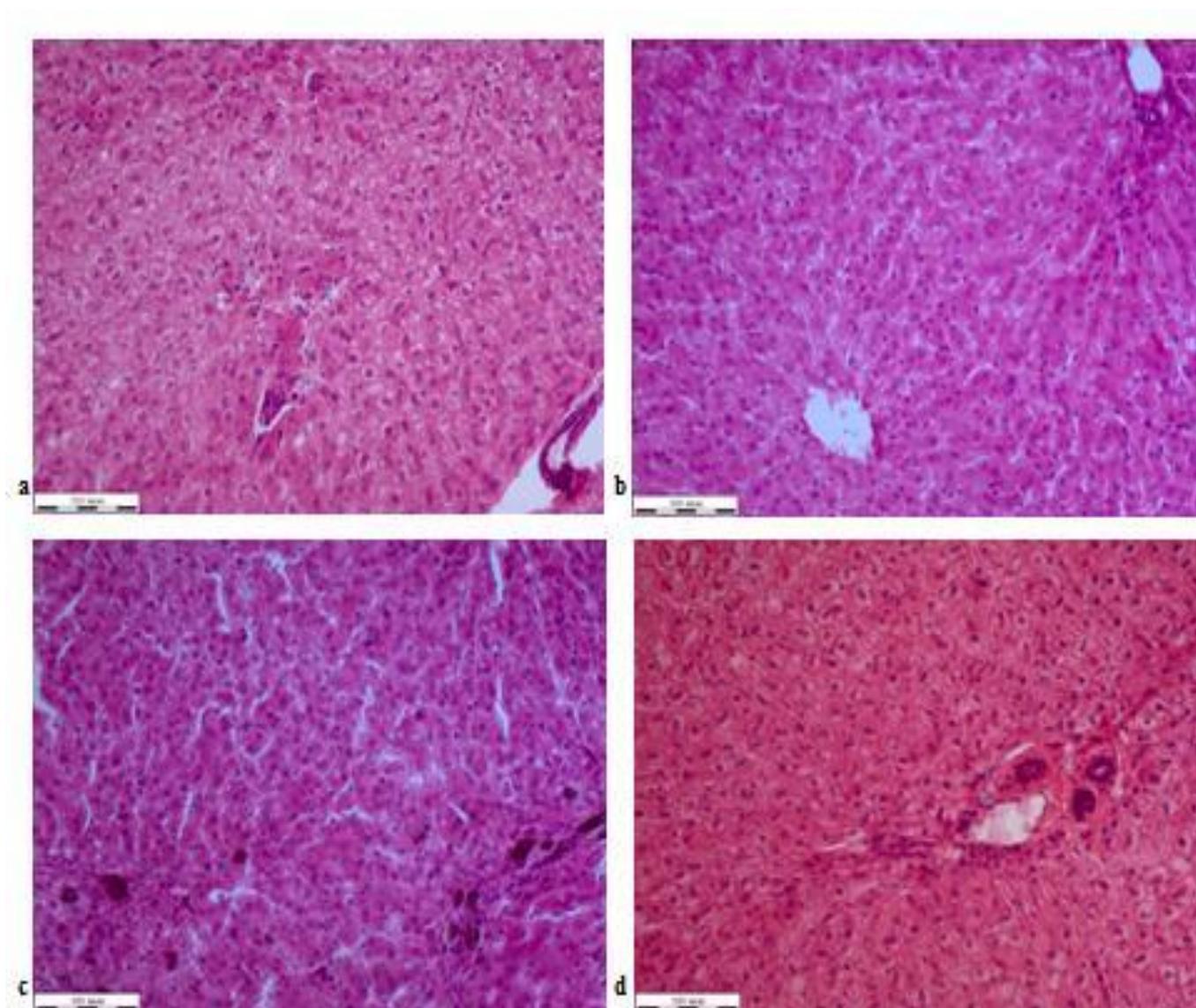


Рисунок 12 – Гистоструктуры печени кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , окраска гематоксилином Гарриса и эозином водным, объектив $\times 20$:

- a** – 1 группа (хроническая интоксикация CdCl_2);
- b** – 2 группа (инфицирование *M. bovis* Bovinus-8);
- c** – 3 группа (инфицирование *M. bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации CdCl_2);
- d** – 4 группа (интактные животные)

В печени кроликов 3-ей группы наблюдали нарушения балочного строения и набухание гепатоцитов, расширение синусоидов, местами определялись скопления бурого пигмента (холестаза). Некоторые гепатоциты были безъядерные с нечеткими контурами.

При исследовании гистологических препаратов печени интактных животных каких-либо нарушений не выявлено. Установлено умеренное кровенаполнение органа. Балочное строение долек не нарушалось, синусоидальные пространства не были расширены. Гепатоциты имели четкую структуру и просветленную цитоплазму. Центролобулярные вены были расширены, преимущественно запустевшие, в печеночных триадах различимы воротная вена, артерия, желчный проток, лимфатический проток, окруженные соединительной тканью.

При гистологических исследованиях почек наиболее выраженные изменения выявлены в 3-ей группе (рис. 13). Обнаружено набухание клеток эпителия извитых канальцев. В просветах капсул клубочков были видны некоторые скопления эозинофильных масс.

В просветах извитых канальцев также определялись эозинофильные массы. У кроликов 1-ой и 2-ой группы наблюдалось набухание клеток эпителия извитых канальцев. В почках животных 4-ой группы изменений гистоструктур не выявлено, клетки эпителия канальцев коры и мозгового слоя без особенностей, строение слоев различимо.

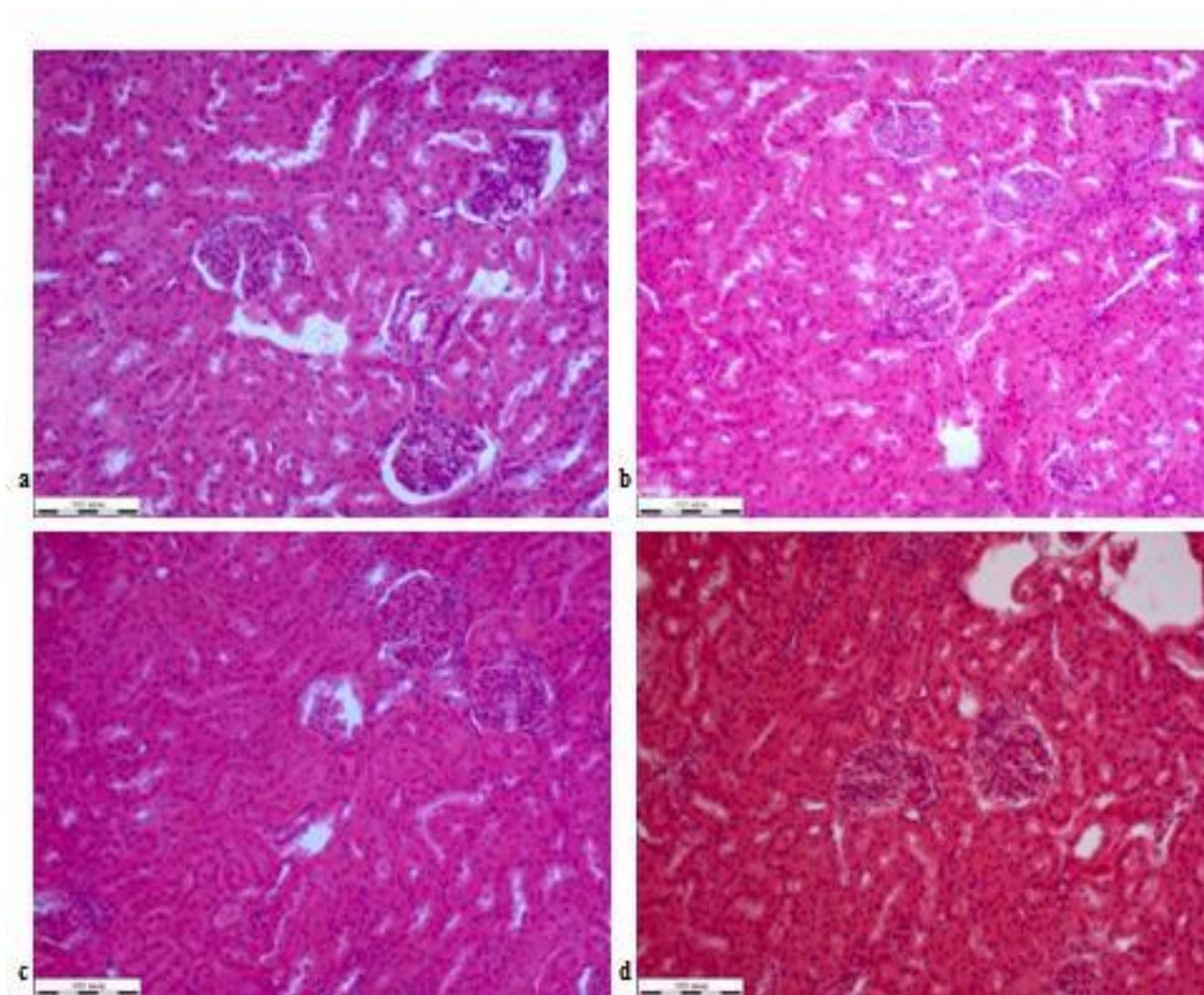


Рисунок 13 – Гистоструктуры почек кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , окраска гематоксилином Гарриса и эозином водным, объектив $\times 20$:

- a** – 1 группа (хроническая интоксикация CdCl_2);
- b** – 2 группа (инфицирование *M. bovis* Bovinus-8);
- c** – 3 группа (инфицирование *M. bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации CdCl_2);
- d** – 4 группа (интактные животные)

Наибольшие изменения гистологических структур тканей легкого выявлены у кроликов 2-ой и 3-ей групп (рис. 14). При исследовании гистологических препаратов легких животных, инфицированных *M.bovis* установлено неравномерное кровенаполнение, в просветах сосудов определялись эритроциты, гомогенные, эозинофильные массы, лимфоцитарные клетки. Стенки бронхов были инфильтрированы лейкоцитами, лимфоцитами. Секреторные клетки набухшие. В просветах бронхов можно было увидеть эозинофильные массы и лейкоциты. Перибронхиально видны скопления полиморфных клеток и фолликулоподобных структур, в центре которых можно было увидеть эозинофильные массы и распадающиеся лейкоциты. Стенки альвеол были утолщены, инфильтрированы лейкоцитами, лимфоцитами. Встречались дистелектазы. В некоторых альвеолах определялись многочисленные альвеолярные клетки, расположенные свободно в просветах. Определялись участки, где просветы альвеол были заполнены лимфоцитами, лейкоцитами, распадающимися клетками, эозинофильными массами.

У животных 3-ей группы на фоне неравномерного кровенаполнения сосудов наблюдались скопления лимфоцитарных клеток в просветах некоторых из них. Периваскулярно также определялись многочисленные лимфоциты, лейкоциты. Стенки сосудов были утолщены, отечные с сохранением слоистого строения. Бронхи были с утолщенными стенками. Определялся отек слизистого слоя, набухание апикальных частей. В просветах бронхов определялись гомогенные эозинофильные массы, единичные лимфоциты, лейкоциты. В перибронхиальной ткани видны были фолликулоподобные структуры с многочисленными лимфоцитарными клетками, некоторые из них находились в состоянии распада. В паренхиме также определялись подобные структуры, и в некоторых из них можно было различить скопление эозинофильных масс и фрагментов лейкоцитарных клеток. Стенки альвеол были утолщены, инфильтрированы лейкоцитами, лимфоцитами, распадающимися клетками, некоторые альвеолы были заполнены эозинофильными массами.

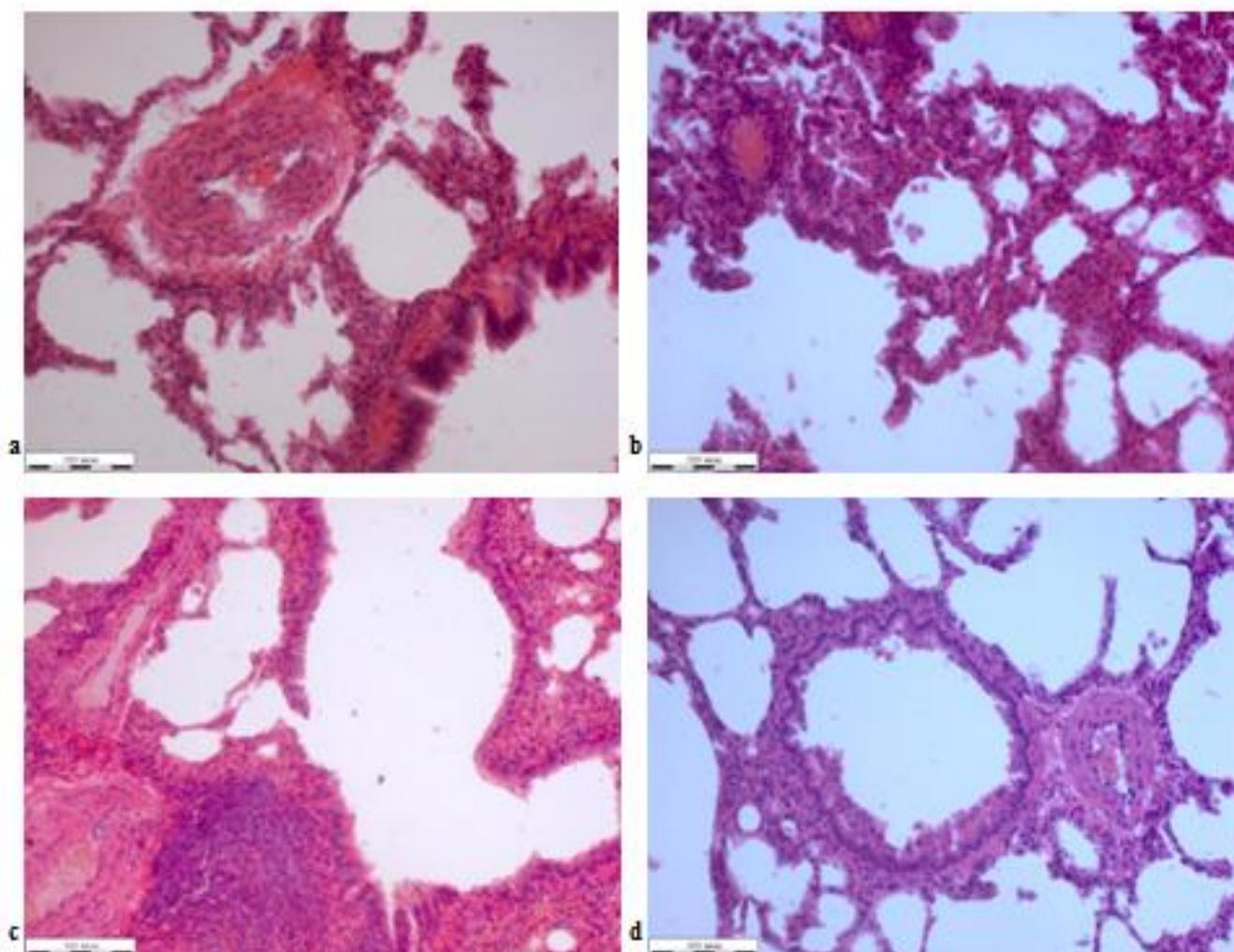


Рисунок 14 – Гистоструктуры легких кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$, окраска гематоксилином Гарриса и эозином водным, объектив $\times 20$:

- a** – 1 группа (хроническая интоксикация $CdCl_2$);
- b** – 2 группа (инфицирование *M. bovis* Bovinus-8);
- c** – 3 группа (инфицирование *M. bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$);
- d** – 4 группа (интактные животные)

В легких кроликов 1-ой группы стенки артериальных сосудов были несколько утолщены, структура их сохранена. Венозные сосуды имели тонкие, гомогенизированные стенки. У животных 4-ой группы в легких наблюдали умеренно кровенаполненные сосуды, альвеолы со свободными просветами, расширенные бронхи, секреторные клетки без особенностей.

Гистологическая структура надпочечников кроликов группы хронической интоксикации характеризовалась гиперхромными клетками клубочкового слоя. При этом некоторые клетки пучкового слоя также были интенсивно окрашенные, в мозговом слое определялись светлые и темные клетки. При инфицировании *M.bovis* так же наблюдались гиперхромные клетки пучковой зоны и частично сетчатой зоны, некоторые из них были деформированные. Тогда как у интактных животных надпочечник был умеренно кровенаполнен, а слои коры хорошо различимы: клубочковый, пучковый и сетчатый.

В лимфатических узлах животных 2-ой и 3-ей групп определялись многочисленные лимфатические клетки, плотно расположены друг к другу (рис.15). Некоторые в виде ядер или обломков. Также в лимфоузлах определялись очаговые скопления эозинофильных масс.

В селезенке кроликов экспериментальных групп наблюдали скопление лимфатических клеток с признаками распада. Кроме того, в группе инфицирования *M.bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$ выявлены малочисленные фолликулярные структуры и скопление лимфоцитов вокруг сосудов.

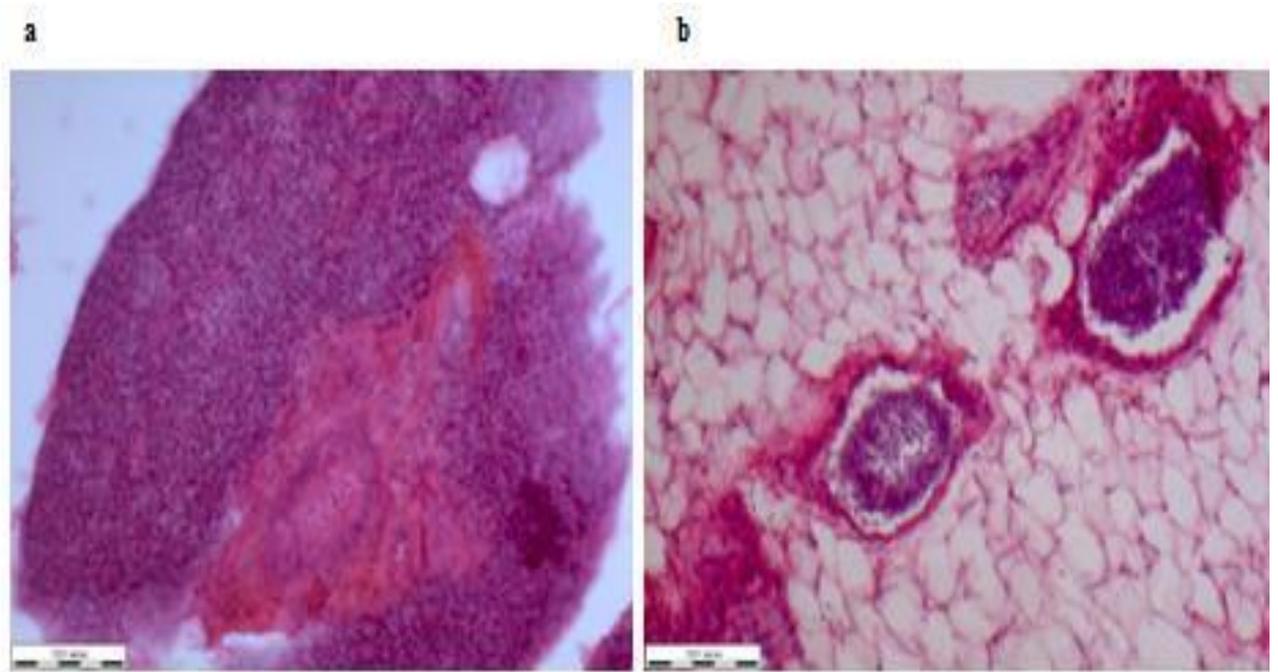


Рисунок 15 – Гистоструктуры лимфатических узлов кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , окраска гематоксилином Гарриса и эозином водным, объектив $\times 20$:

a – 2 группа (инфицирование *M. bovis* Bovinus-8);

b – 3 группа (инфицирование *M. bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации CdCl_2)

При патоморфологическом анализе и гистологическом исследовании внутренних органов кроликов выявлены более выраженные морфофункциональные нарушения внутренних органов у животных инфицированных *M.bovis* на фоне хронической кадмиевой интоксикации, вызванные как хроническим воздействием малых доз металла, так и течением инфекционного процесса. Так, массовый коэффициент селезенки был в 2 раза выше, чем в контрольной группе, обнаружили скопление лимфатических клеток с признаками распада. Печень по показателю массового коэффициента в экспериментальных группах была больше на 25-28%, чем у интактных животных, а гистоструктурные изменения в печени варьировали от набухания гепатоцитов до нарушения балочного строения.

Изменения структуры печени и селезенки при инфицировании туберкулезом бычьего типа и хроническом воздействии кадмия описаны в статье «Патоморфологические изменения у кроликов при заражении *Micobacterium bovis* на фоне хронической интоксикации тяжелыми металлами (Валеева А.Р., Конюхова В.А., Хисматуллина Н.А., Ахмадеев Р.М., Шуралев Э.А., Мукминов М.Н, 2015).

3.3.2 Бактериологические исследования и молекулярно-генетический анализ

Для определения культурально-морфологических, биохимических свойств микобактерий, фенотипической изменчивости возбудителя под влиянием солей кадмия проведены бактериологические исследования.

При посеве суспензий приготовленных из органов кроликов всех экспериментальных групп микобактерии выделили во 2-ой и 3-ей группах (табл. 13). В 3-ей экспериментальной группе микобактерии были выделены из следующих органов: сердце, печень, почки, легкие, лимфатические узлы и миндалины. У животных 2-ой экспериментальной группы в миндалинах и легких микобактерии не были выявлены. При этом индекс инфицированности во 2-ой и 3-ей группах составил 78 и 85% соответственно.

Видимый рост клеток при культивировании микобактерий, выделенных из органов животных инфицированных *M.bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$ (3-я группа) наблюдали через 5 недель, тогда как контрольный штамм и клетки, выделенные из органов кроликов 2-ой группы, давали рост уже начиная с 3 недели. При этом количество и размер колоний уменьшались.

Таблица 13 – Распространение микобактерий в организме кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$

Группа	Орган					
	Печень	легкие	почки	Сердце	миндалины	лимфоузлы
1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	+	+	-	+
3	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-

При анализе результатов биохимических тестов, каких-либо различий между клетками, выделенными из органов кроликов 3-ей группы, и контрольными штаммами не выявлено (табл. 14). Все показатели соответствовали общепринятым биохимическим свойствам исследуемого штамма микобактерий.

Таблица 14 – Биохимические свойства микобактерий, выделенных из внутренних органов кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$

Тест	<i>M.bovis</i> Bovinus-8			<i>M.tuberculosis</i> H37Rv
	контрольный штамм	клетки, выделенные из внутренних органов кроликов 2-ой группы	клетки, выделенные из внутренних органов кроликов 3-ей группы	контрольный штамм
на способность продуцировать ниацин	-	-	-	+
на наличие нитратредуктазы	-	-	-	+
на каталазную активность	-	-	-	-
на наличие киллой фосфатазы	+	+	+	+

Фенотипическая изменчивость штамма *M.bovis* Bovinus-8 под влиянием хлорида кадмия не установлена. Форма и окрас клеток соответствовали контрольному штамму (рис. 16).

В результате проведенного анализа гелей выявлено большее количество фракций электрофоретической разгонки проб обработанных на приборе Fast Prep по сравнению с исходными клетками (рис. 17). Обработка позволяет более детально анализировать клеточные фрагменты. Выявлено некоторое различие в полипептидном спектре разрушенных клеток *M.bovis* Bovinus-8, выделенных из органов кроликов 3-ей группы, по сравнению с контрольным штаммом.

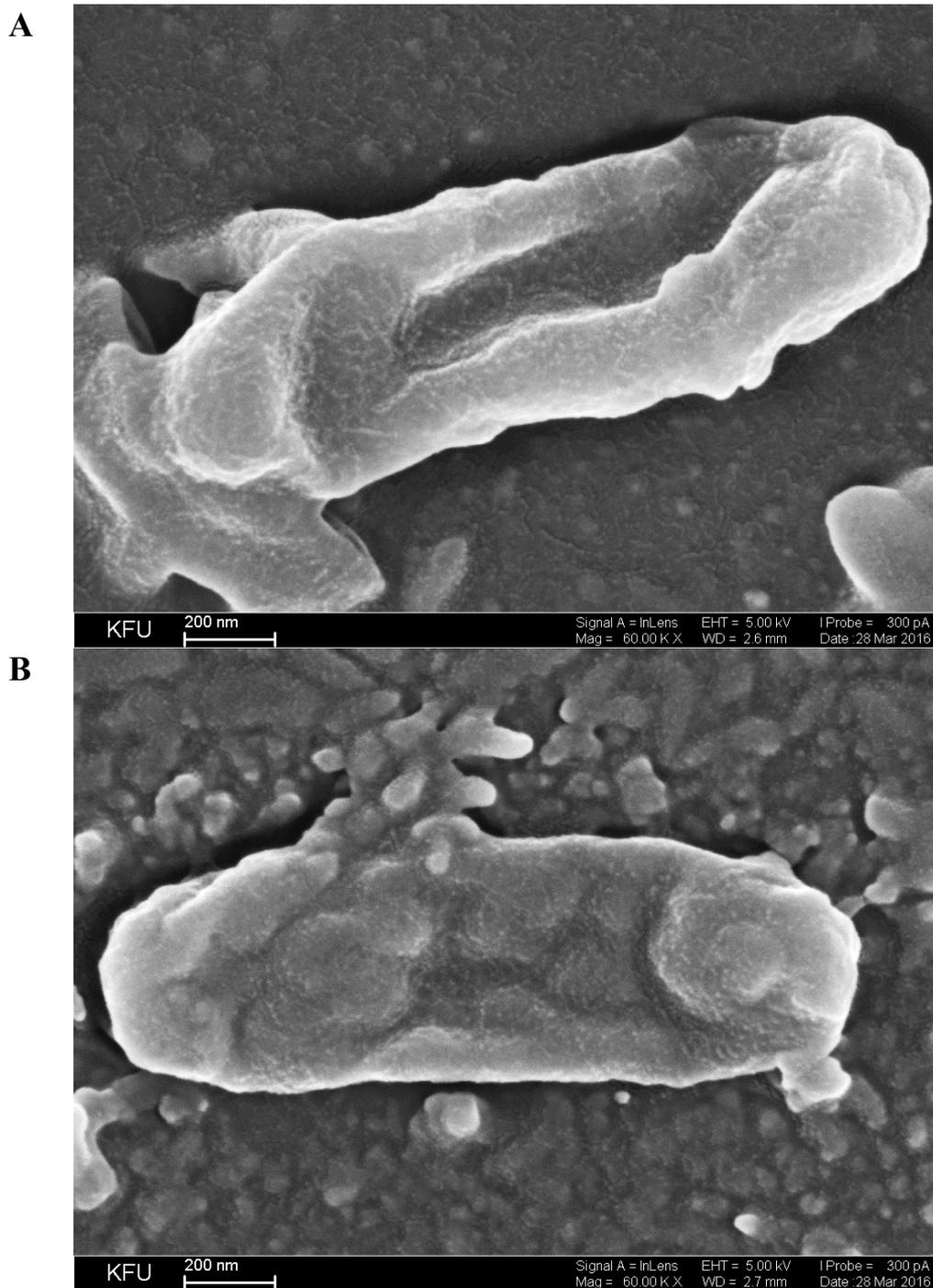


Рисунок 16 – Сканирующая автоэмиссионная электронная микроскопия клеток *M.bovis*, выделенных из внутренних органов кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , напыление золота-палладия:

A – клетки выделенные из органов кроликов инфицированных *M.bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации CdCl_2 ;

B – контрольный штамм *M.bovis* Bovinus-8

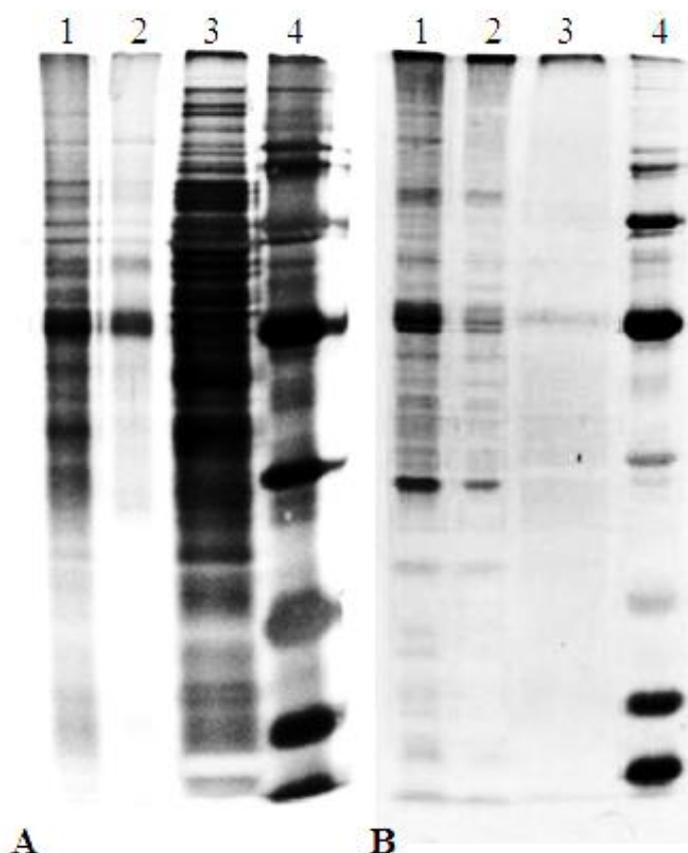


Рисунок 17 – Электрофорез клеток *M.bovis* Bovinus-8, выделенных из внутренних органов кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , окрашивание озотнокислым серебром:

А (клетки выделенные из органов кроликов инфицированных *M.bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации CdCl_2): 1 – взвесь разрушенных клеток на приборе Fast Prep (лизат); 2 – супернатант разрушенных клеток (лизат) на приборе Fast Prep; 3 – исходные клетки; 4 – маркер Bio Rad broad range;

В (контрольный штамм *M.bovis*): 1 – взвесь разрушенных клеток на приборе Fast Prep (лизат); 2 – супернатант разрушенных клеток (лизат) на приборе Fast Prep; 3 – исходные клетки; 4 – маркер Bio Rad broad range

Ранее (Hotter G.S., Wilson T., Collins D.M., 2001) сообщалось о кадмий индуцируемом белке 17кДа (CadI), который способны синтезировать микобактерии МТВ complex, что обусловлено кодирующим геном Rv2641. Данное обстоятельство указывает на то, что для выяснения причины различий белковых спектров необходимо продолжить пассирование клеток.

В ходе молекулярно-генетического исследования суспензий органов животных экспериментальных групп, инфицированных *M.bovis*, выявлены нуклеотидные последовательности аналогичные ДНК исходной (нативной) культуры, которую использовали для экспериментального заражения (табл. 15).

Таблица 15 – Соответствие возбудителя, выделенного из суспензий внутренних органов кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$, нативной культуре

Группа	№ животного	Наименование органа	Род <i>Mycobacterium</i>	<i>M.bovis</i> BCG	МТВ
исходная культура <i>M.bovis</i> Bovinus-8			+	+	+
инфицирование <i>M.bovis</i> Bovinus-8	1	печень	+	+	+
		легкие	+	+	+
		почки	+	+	+
		сердце	+	+	+
		миндалины	+	+	+
		лимфоузлы	+	+	+
	2	печень	+	+	+
		легкие	+	+	+
		почки	+	+	+
		сердце	+	+	+
		миндалины	+	+	+
		лимфоузлы	+	+	+
	3	печень	+	+	+
		легкие	+	+	+
		почки	+	+	+
		сердце	+	+	+
		миндалины	+	+	+
		лимфоузлы	+	+	+
инфицирование <i>M.bovis</i> Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$	4	печень	+	+	+
		легкие	+	+	+
		почки	+	+	+
		сердце	+	+	+
		миндалины	+	+	+
		лимфоузлы	+	+	+

Продолжение таблицы 15

Группа	№ животного	Наименование органа	Род <i>Mycobacterium</i>	<i>M.bovis</i> BCG	МТВ
инфицирование <i>M.bovis</i> Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации CdCl ₂	5	печень	+	+	+
		легкие	+	+	+
		почки	+	+	+
		сердце	+	+	+
		миндалины	+	+	+
		лимфоузлы	+	+	+
	6	печень	+	+	+
		легкие	+	+	+
		почки	+	+	+
		сердце	+	+	+
		миндалины	+	+	+
		лимфоузлы	+	+	+
интактные животные	7	печень	-	-	-
		легкие	-	-	-
		почки	-	-	-
		сердце	-	-	-
		миндалины	-	-	-
		лимфоузлы	-	-	-
	8	печень	-	-	-
		легкие	-	-	-
		почки	-	-	-
		сердце	-	-	-
		миндалины	-	-	-
		лимфоузлы	-	-	-
	9	печень	-	-	-
		легкие	-	-	-
		почки	-	-	-
		сердце	-	-	-
		миндалины	-	-	-
		лимфоузлы	-	-	-

Установлено, что хроническая кадмиевая интоксикация усугубляет патогенез туберкулеза у кроликов, выраженное в более высоком уровне индекса инфицированности *M.bovis*: 78% в группе инфицирования и 85% у животных, инфицированных на фоне хронической кадмиевой интоксикации. Фенотипически и генетически микобактерии, выделенные из органов инфицированных кроликов,

в том числе и на фоне хронической интоксикации хлоридом кадмия, соответствовали контрольному штамму (исходная культура). Однако выявлено некоторое различие в полипептидном спектре, что требует дополнительных исследований.

Результаты опубликованы в работе «Кадмий индуцированные изменения свойств микобактерий» (Шуралев Э.А., Валеева А.Р., Мукминов М.Н., 2016).

3.3.3 Остаточное содержание кадмия в органах и тканях кроликов после интоксикации и инфицирования *Micobacterium bovis*

Характер распределения и степень накопления кадмия в органах и тканях кроликов изучали, анализируя данные об остаточном содержании. Для этого отбирали пробы печени, почек, легких, сердца, селезенки, а также костной и мышечной ткани. По данным Конюховой В.А. (2001) при ежедневной затравке кроликов CdCl_2 (1,5 мг/кг) органами мишенями для накопления металла являются почки и печень. Такая картина сохраняется для других видов животных и в сочетании с различными экотоксикантами (Вафин И.Ф., 2010; Софронов П.В., 2009).

При изучении остаточного содержания кадмия в органах и тканях животных (табл. 16) выявили более быстрое накопление металла в 3-ей группе (заражение *M.bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации хлористым кадмием), чем в 1-ой.

Таблица 16 – Остаточное содержание Cd в органах и тканях кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , мг/кг ($M \pm m$)

Органы и ткани	Группы			
	1	2	3	4
печень	6,50±3,70	0,05±0,01	14,72±3,5*	0,04±0,01
почки	7,64±0,39*	0,35±0,09	44,54±2,02*	0,26±0,01
легкие	0,25±0,05	< п.о.	0,45±0,05	< п.о.
сердце	0,15±0,05	< п.о.	0,28±0,05	< п.о.
селезенка	1,29±0,02	< п.о.	1,44±0,02	< п.о.
костная ткань	< п.о.	< п.о.	0,08±0,01	< п.о.
мышечная ткань	0,08±0,02	< п.о.	0,13±0,01	< п.о.

Примечание: * $p < 0,05$ относительно показателя контрольной группы;
< п.о. показатель ниже предела обнаружения

У животных 3-ей группы Cd обнаружили в печени, почках, легких, селезенке, сердце мышечной и костной тканях, тогда как в костной ткани

животных 1-ой группы уровень Cd был ниже порога обнаружения. При этом наибольшее накопление наблюдали в печени ($6,5 \pm 3,70$ мг/кг – в 1-ой, $14,72 \pm 3,5$ мг/кг в 3-ей группе) и почках ($7,6 \pm 3,5$ и $44,54 \pm 2,02$ мг/кг соответственно). В группе инфицированных животных (2-ая группа) кадмий был обнаружен только в печени и почках, при этом его уровень был близок к показателям группы интактных животных.

Таким образом, наибольшее накопление металла наблюдали в органах мишенях почках и печени. Течение инфекционного процесса при инфицировании *M.bovis* Bovinus-8 усугубляло действие хронической интоксикации, содержание кадмия в почках животных, инфицированных на фоне хронической кадмиевой интоксикации, превышало уровень кроликов группы хронической интоксикации в 6 раз, а в печени более чем в 2 раза.

Результаты исследования отражены в статье «Патоморфологические изменения у кроликов при заражении *Micobacterium bovis* на фоне хронической интоксикации тяжелыми металлами» (Валеева А.Р., Конюхова В.А., Хисматуллина Н.А., Ахмадеев Р.М., Шуралев Э.А., Мукминов М.Н, 2015).

3.4 Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса и продуктов убоя кроликов, инфицированных *Micobacterium bovis* на фоне хронической интоксикации хлоридом кадмия

При анализе результатов ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и продуктов убоя кроликов установлено их несоответствие гигиеническим требованиям, предъявляемым к безопасности и качеству пищевых продуктов.

Так результаты органолептического осмотра, представленные в разделе 3.3.1, указывают на морфофункциональные нарушения внутренних органов, вызванные как хроническим воздействием малых доз CdCl_2 , так и патогенезом туберкулеза. Кроме того, в разделе освещены результаты гистологических исследований, которые подтверждают структурные изменения селезенки, печени, почек, надпочечников и легких у животных 1-ой, 2-ой и 3-ей экспериментальных групп. Выявленные морфофункциональные нарушения внутренних органов требуют дополнительных микробиологических и физико-химических исследований по определению причин поражения.

При анализе микробиологических исследований (раздел 3.3.2) установлено туберкулезное поражение внутренних органов животных групп инфицирования *M.bovis* Bovinus-8 и инфицирования на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , индекс инфицированности равен 78-85%.

Результаты анализа на остаточное содержание Cd, представленное в разделе 3.3.3, указывает на накопление металла в органах и тканях убойных животных, подвергавшихся хронической интоксикации CdCl_2 (рис. 18).

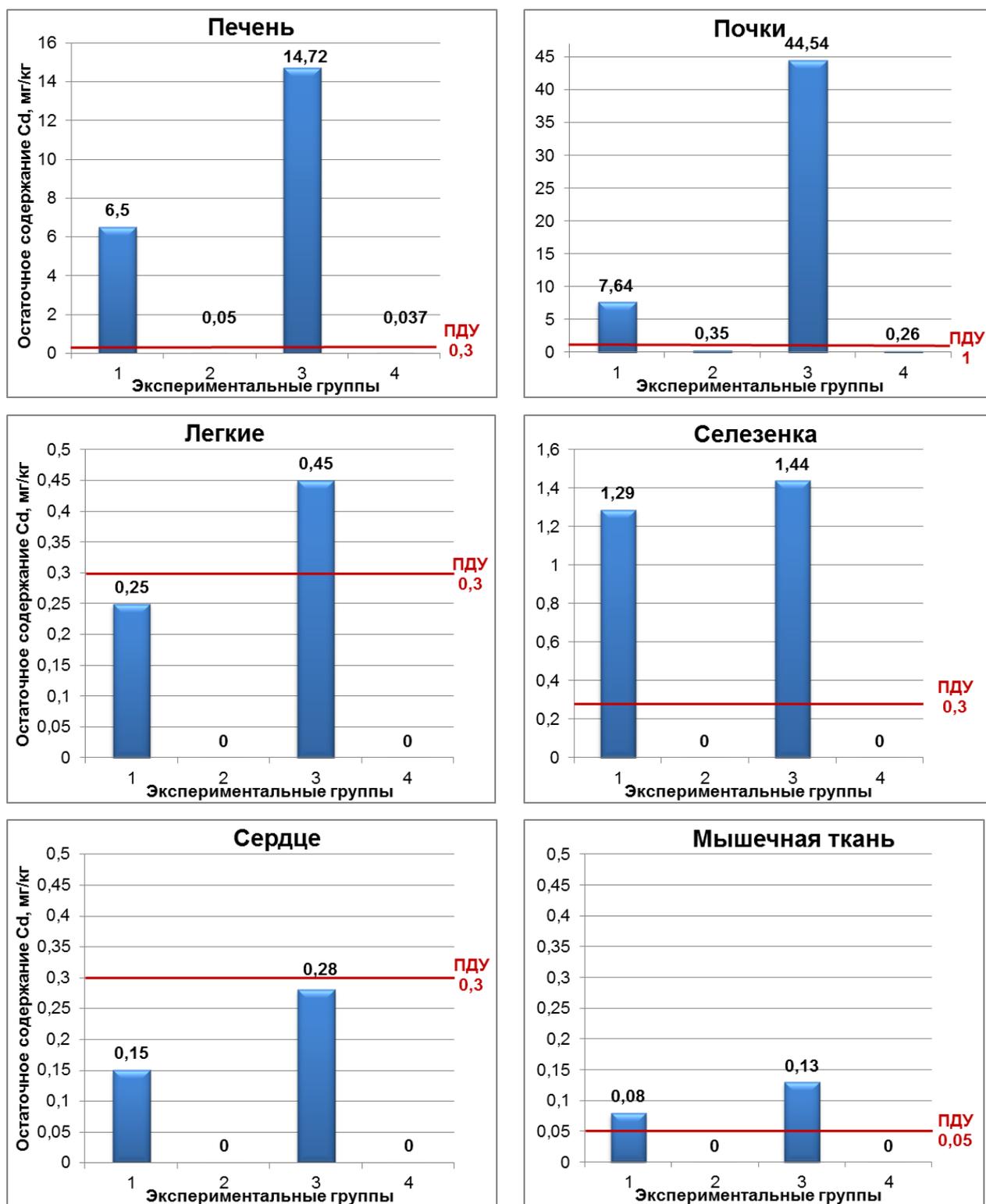


Рисунок 18 – Уровень содержания Cd в мясе и продуктах убоя кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$, мг/кг: 1 группа (хроническая интоксикация $CdCl_2$); 2 группа (инфицирование *M.bovis* *Vovinus-8*); 3 группа (инфицирование *M.bovis* *Vovinus-8* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$); 4 группа (интактные животные)

В почках кроликов 1-ой и 3-ей групп выявлено превышение допустимого уровня кадмия для субпродуктов убойных животных в 7,5 и более 40 раз соответственно. В печени количество металла было выше ПДУ в 21 раз в 1-ой группе и в 50 раз в 3-ей. В селезенке обнаружено 4-5-кратное превышение ПДУ по Cd. В остальных органах кроликов уровень Cd соответствовал норме и был лишь незначительно выше ПДУ в легких кроликов 3-ей группы. В мясе кроликов, подвергавшихся хронической интоксикации $CdCl_2$, количество металла было выше ПДУ на 60%. Тогда как в 3-ей группе (животные, инфицированные *M.bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$) уровень Cd превышал ПДУ в 2,5 раза.

Таким образом, выявлено поражение внутренних органов и тканей кроликов, соответствующее инфекционному процессу и отравлению, указывающее на необходимость утилизации. После проведения всех исследований тушки и органы были уничтожены сжиганием, с составлением соответствующего акта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое распространение туберкулеза на фоне увеличения зон с высокой антропогенной нагрузкой определяет актуальность изучения влияния кадмиевой интоксикации на состояние здоровья организма и его устойчивость к заболеванию. В исследовании использовали широкий перечень методов. Которые позволили комплексно оценить негативное влияние хронической кадмиевой интоксикации на функциональные показатели состояния здоровья и специфического иммунитета кроликов при инфицировании *Micobacterium bovis*. В ходе исследования выявлены замедление роста и развития, нарушение белкового обмена и изменении активности ферментов, лейкоцитарной формулы, подавление Т-клеточного звена иммунитета, угнетение функциональной активности В-лимфоцитов и гуморального иммунного ответа, морфофункциональные нарушения внутренних органов у животных инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$, вызванные как хроническим воздействием малых доз кадмия, так и течением инфекционного процесса.

По результатам проведенных исследований сформулированы следующие

ВЫВОДЫ:

1. Комплексным исследованием установлено угнетающее воздействие хронической кадмиевой интоксикации на естественную резистентность и специфический иммунный ответ при патогенезе туберкулеза.

2. При инфицировании кроликов микобактериями туберкулеза бычьего типа на фоне хронической интоксикации малыми дозами хлорида кадмия выявлено замедление роста и развития, прирост живой массы составляет 3 % против 6% в группе интоксикации, 13 % в группе инфицирования и 27 % у интактных животных.

3. Установлены нарушения белковообразовательной функции печени и изменения активности сывороточных ферментов, свойственные как токсическому

поражению, так и патогенезу туберкулеза. Показатели уровня белковых фракций у животных, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической кадмиевой интоксикации, превышали значения контрольной группы на 9-13% (достигая уровня $1,27 \pm 0,40$ г/дл для α - и $0,87 \pm 0,06$ г/дл для β -глобулинов), а динамика изменения уровня γ -глобулина характеризовалась резким увеличением концентрации на 21-е и 35-е сутки до $2,40 \pm 1,25$ г/дл, что в 2 раза превышает показатель интактных кроликов ($p < 0,05$). Наибольшие значения АСТ и АЛТ выявлены на 14 и 35 сут исследования ($268,97 \pm 34,58$ нкат/л и $577,70 \pm 19,69$ нкат/л, соответственно). Уровень ЦП достигал максимальных значений на 35 сут, $1,10 \pm 0,45$ г/л, что превышало показатели остальных групп в 1,5-2 раза ($p < 0,05$).

4. Выявлены более выраженные изменения показателей лейкоцитарной формулы, которые указывают на тяжесть проходящих в организме кроликов процессов и ослабление неспецифических иммунных реакций, что проявляется в угнетении функциональной активности В-лимфоцитов и гуморального иммунного ответа, и в подавлении выработки Т-лимфоцитов, с усугублением противотуберкулезного клеточного иммунного ответа. Уровень Т-лимфоцитов в крови животных, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической кадмиевой интоксикации, к концу эксперимента (60 сут исследования) снижался до $26,00 \pm 8,49$ %, тогда как в группе интактных животных он составлял $58,00 \pm 10,58$ %. Уровень содержания В-лимфоцитов в крови опытных животных достоверно не отличался от данных, полученных в группе интактных животных, и варьировал в пределах от $8,00 \pm 2,00$ до $16,75 \pm 2,50$ %.

5. Получены антигены из экстракта клеток с широким спектром структурных компонентов, распределяющимся в диапазоне молекулярных масс от 200 до 6,5 кДа, и вторичных метаболитов микобактерий *M.bovis* с диапазоном от 200 до 16,1 кДа. Установлено, что спектр полученных препаратов из экстракта клеток *M.bovis* Bovinus-8 и их вторичных метаболитов охватывает комплекс диагностически значимых антигенов, что исключает получение ложноотрицательных результатов при оценке специфического гуморального

иммунитете при туберкулезе. С положительной сывороткой реагировали фракции антигена, полученного из вторичных метаболитов *M.bovis* Bovinus-8, с молекулярными массами 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа, а антигенный материал из экстракта клеток был активен в зоне от 82,3 до 6,5 кДа.

6. Разработаны оптимальные условия и режимы постановки ИФА с использованием вторичных клеточных метаболитов и экстракта клеток *M.bovis*. При постановке ИФА с гипериммунной сывороткой кролика оптическая плотность достигала 3,203 ОЕ при использовании в качестве антигена вторичных клеточных метаболитов и была выше 3,500 ОЕ при использовании экстракта клеток.

7. Серологическими исследованиями установлено, что интоксикация хлоридом кадмия приводит к угнетению выработки специфических антител у кроликов при инфицировании *M.bovis*. Значения оптической плотности в ИФА достигали 0,947 и 0,221 ОЕ для указанных антигенов соответственно. Задержка в иммунном ответе составляла до 28-42 суток, при этом иммуноблотом выявлены антитела только к антигенным фракциям, локализованным в низкомолекулярной зоне.

8. При патоморфологическом анализе и гистологическом исследовании внутренних органов кроликов выявлены более выраженные морфофункциональные нарушения внутренних органов у животных, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической кадмиевой интоксикации, вызванные как хроническим воздействием малых доз металла, так и течением инфекционного процесса. Так, массовый коэффициент селезенки был в 2 раза выше, чем в контрольной группе, обнаружили скопление лимфатических клеток с признаками распада. Печень по показателю массового коэффициента в экспериментальных группах была больше на 25-28%, чем у интактных животных, а гистоструктурные изменения в печени варьировали от набухания гепатоцитов до нарушения балочного строения.

9. Установлено, что хроническая кадмиевая интоксикация усугубляет

патогенез туберкулеза у кроликов, выраженное в более высоком уровне индекса инфицированности *M.bovis*: 78% в группе инфицирования и 85% у животных, инфицированных на фоне хронической кадмиевой интоксикации. Фенотипически и генетически микобактерии, выделенные из органов инфицированных кроликов, в т.ч. и на фоне хронической интоксикации хлоридом кадмия, соответствовали контрольному штамму (исходная культура). Однако выявлено некоторое различие в полипептидном спектре, что требует дополнительных исследований.

10. Выявлена наибольшая кумуляция кадмия в почках и печени животных, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической кадмиевой интоксикации, $44,54 \pm 2,02$ мг/кг и $14,72 \pm 3,5$ мг/кг соответственно, что превышало показатель у кроликов группы хронической интоксикации в 2-6 раз, а контрольной группы в 171-368 раз.

11. При анализе результатов ветеринарно-санитарной экспертизы выявлено несоответствие мяса и продуктов убоя кроликов при инфицировании *M.bovis* Bovinus-8, хронической интоксикации хлоридом кадмия и их сочетанном воздействии гигиеническим требованиям, предъявляемым к безопасности и качеству пищевых продуктов. В почках кроликов групп хронической кадмиевой интоксикации выявлено превышение допустимого уровня кадмия для субпродуктов убойных животных в 40 раз, в печени – в 50 раз, в селезенке – 5-кратное превышение ПДУ, в мясе кроликов – в 2,5 раза.

В ходе работы над диссертацией разработаны способы получения микобактериальных антигенов и гипериммунной сыворотки к ним. Серологическими исследованиями подтверждена целесообразность мультиантигенного подхода при разработке серодиагностики туберкулеза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А/Г	белковый индекс, отношение количества альбуминов к количеству глобулинов в сыворотке крови
АГ	антиген
АТ	антитело
АЛТ	аланинаминотрансфераза
АСТ	аспартатаминотрансфераза
БОК	бляшкообразующие клетки
ВАК	Высшая аттестационная комиссия
ВИЭВ	Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии
ГОСТ	Государственный стандарт
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	иммуноферментный анализ
КФУ	Казанский федеральный университет
ЛД ₅₀	среднесмертельная доза
МДА	малоновый диальдегид
МДУ	минимально допустимый уровень
МТ	металлотионин
ОБ	общий белок сыворотки
ОП	оптическая плотность
ОЕ	оптические единицы
ПААГ	полиакриламидный гель
ПДК	предельно допустимая концентрация
ППД	очищенный туберкулин (purified protein derivative)
п.о.	предел обнаружения

ПОЛ	перекисное окисление липидов
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РТ	Республика Татарстан
РФ	Российская Федерация
СП	Санитарно-эпидемиологические правила
сут	сутки
ТБ	туберкулез
ТМ	тяжелые металлы
ТМБ	тетраметилбензидин
ФБР-Т	фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением Твина
ФГБНУ	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
ФЦТРБ	«Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»
ВНИВИ	Всероссийский научно-исследовательский институт
ФР	физиологический раствор
ЦИК	циркулирующие иммунные комплексы
ЦП	церулоплазмин
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (синдром приобретенного иммунодефицита)
BCG	Bacillus Calmette-Guérin (бацилла Кальмета-Герена)
CdCl ₂	хлорид кадмия
HIV	Human Immunodeficiency Virus (вирус иммунодефицита человека)
MAIS	комплекс avium-intracellulare
MCV	Mean Cell Volume (средний объем эритроцита)
MTB complex	туберкулезный комплекс
PBS	Phosphate Buffered Saline (фосфатно-солевой буфер)

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Авербах, М.М. Роль липидных компонентов *M.tuberculosis* в образовании туберкулезной гранулемы / М.М. Авербах // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 3. – С. 15-19.
2. Агбалян, Е.В. Характеристика генотоксических и цитотоксических эффектов малых доз кадмия / Е.В. Агбалян, Е.В. Шинкарук // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 6-3. – С. 427-431.
3. Агеева, Т.Н. Корреляционная зависимость выявления в крови иммунных комплексов и микобактериальных антигенов с помощью ИФА и результатов бактериологической диагностики туберкулеза на среде ВКГ / Т.Н. Агеева, А.П. Лысенко, Е.М. Красникова // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2005. – № 2. – С. 39-42.
4. Алиева, Е.В. Опыт получения иммунных сывороток для производства диагностических препаратов / Е.В. Алиева, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, М.П. Лаврешин, Н.Е. Афанасьев, Е.А. Горобец, А.А. Семирчева, А.Ю. Миронова // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2008. – № 1 – С. 10-13.
5. Александрова, Н.М. Индикация возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота молекулярно-генетическими методами / Н.М. Александрова, Т.Х. Фаизов, А.В. Иванов, И.К. Фахретдинов // Вестник Казанского ГАУ. – 2011. – № 3 (21). – С. 109-112.
6. Альфредо, Э. Способ получения антигена с молекулярной массой 45 кДа из *Mycobacterium tuberculosis* / Э. Альфредо, В.И. Вершинина, К.С. Хаертынов, С.В. Герасимова, Н.Г. Уразов, И.М. Хаертынова // Журнал фундаментальные исследования. – 2013. – № 1. – С. 18-22.

7. Альфредо, Э. Получение антигенов *Micobacterium tuberculosis* и выявление наиболее значимых из них для диагностики туберкулеза: дис. ...канд. биол. наук.: 03.02.03 / Альфредо Элдар. – Казань, 2013. – 98 с.
8. Андреевская, С.Н. Экспрессия генов, кодирующих индуцибельные субъединицы иммунопротеасомы, макрофагами, инфицированными *M.bovis* BCG и *M.tuberculosis* H37Rv / С.Н. Андреевская, Т.Г. Смирнова, А.В. Тимофеев, Е.Е. Ларионова, Л.Н. Черноусова // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – Т. 92, № 2. – С. 36-40.
9. Ахметзянова, Ф.К. Содержание тяжелых металлов в кормах и молоке коров в регионе нефтедобычи / Ф.К. Ахметзянова, Г.Г. Ильязов, Л.П. Зарипова, Р.Р. Зайсанов // Ученые записки КГВАМ. – 2005. – Т. 180. – С. 9-16.
10. Бажин, М.А. Методы оценки Т- и В-систем иммунитета крупного рогатого скота при бруцеллезе и туберкулезе: методические рекомендации / М.А. Бажин, В.А. Мироненко, С.К. Переходов, В.Л. Солодовников, Ю.И. Пацула – Омск: ВНИИБТЖ, 1989. – 36 с.
11. Блум, Б.Р. Туберкулёз. / Под ред. Б.Р. Блума. – М.: Медицина, 2002. – 677 с.
12. Бреус, И.П. Миграция тяжелых металлов с инфильтрационными водами в основных типах почв среднего Поволжья. / И.П. Бреус, Г.Р. Садриева // Агрохимия. – 1997. – № 6. – С. 56-59.
13. Валеева, А.Р. Влияние интоксикации кадмием на антителогенез кроликов при экспериментальном инфицировании *Micobacterium bovis* / А.Р. Валеева // Ветеринарный врач. – 2016. – № 3 – С. 8-13.
14. Валеева, А.Р. Гематологические показатели кроликов при туберкулезе и кадмиевой интоксикации / А.Р. Валеева // Аграрная наука – 2016. – № 8 – С. 27-29.

15. Валеева, А.Р. Изыскание эффективных средств лабораторной диагностики туберкулеза / А.Р. Валеева // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий: матер. III Межд. науч. Интернет-конф. – Казань, 2012. – С. 78-79.

16. Валеева, А.Р. Изучение серологической активности антигена с молекулярной массой в 45/47 кДа из *Mycobacterium tuberculosis* / А.Р. Валеева, Н.А. Хисматуллина, А.П. Цибулькин, А.М. Гулюкин, Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, Р.М. Ахмадеев, Т.А. Невзорова, К.С. Хаертынов, А.В. Москвичева // Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли: матер. IV Междунар. науч.-практ. конф. / Под редакцией Зыятдинова К.Ш. – Казань: ИД «Меддок», 2014 – С. 31-37.

17. Валеева, А.Р. Культурально-морфологическая и электрофоретическая характеристика различных микобактерий / А.Р. Валеева, К.С. Хаертынов, Э.А. Шуралев, А.М. Гулюкин, Н.А. Хисматуллина, М.Н. Мукминов, Р.М. Ахмадеев // Окружающая среда и устойчивое развитие регионов Том I: Теория и методы изучения и охраны окружающей среды. Экологические основы природопользования / Под ред. проф. Латыповой В.З., проф. Ермолаева О.П., проф. Роговой Т.В., проф. Зариповой Ш.Х. – Казань: Изд-во «Отечество», 2013. – С. 50-52.

18. Валеева, А.Р. Некоторые физиологические и биохимические показатели кроликов при патогенезе туберкулеза на фоне интоксикации тяжелыми металлами / А.Р. Валеева, Р.М. Ахмадеев, З.З. Алеева // Актуальные направления инновационного развития животноводства и ветеринарной медицины: матер. Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Уфа: Башкирский ГАУ, 2014. – С. 16-18.

19. Валеева, А.Р. Патоморфологические изменения у кроликов при заражении *Micobacterium bovis* на фоне хронической интоксикации тяжелыми металлами / А.Р. Валеева, В.А. Конюхова, Н.А. Хисматуллина, Р.М. Ахмадеев, Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – № 2 – С. 28-30.

20. Валеева, А.Р. Создание тест-систем для серодиагностики туберкулеза / А.Р. Валеева // Матер. IV Межд. Казанского инновационного нанотехнологического форума (NANOTECH'2012) – Казань, 2012. – С. 442.

21. Валеева, Г.Р. О некоторых факторах накопления химических элементов растениями / Г.Р. Валеева, В.З. Латыпова, Р.И. Винокурова, Е.Р. Иванова // Юг России: экология, развитие. – 2012. – № 2. – С. 63-72.

22. Васильева, Е.В. Сравнительная ценность квантиферонового теста, неоптерина и специфических противотуберкулезных антител для клинико-лабораторной диагностики туберкулеза легких / Е.В. Васильева, С.В. Лапин, Т.В. Блинова, И.Ю. Никитина, И.В. Лядова, В.Н. Вербов, А.А. Тотолян // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 5. – С. 21-26.

23. Вафин, И.Ф. Влияние цеолита и сульфида натрия на естественную резистентность животных при сочетанном отравлении диоксином и хлоридом кадмия / И.Ф. Вафин, К.Х. Папуниди, В.А. Новиков, И.Р. Кадиков // Ветеринарный врач. – 2010. – № 3 – С.14-16.

24. Верховский, О.А. Диагностическое значение реакций клеточного иммунитета при туберкулезе крупного рогатого скота / О.А. Верховский, А.Х. Найманов, О.А. Савицкая // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных. – М.: Изографъ, 2006. – С. 180-184.

25. Волкова, О.В. Основы гистологии с гистологической техникой. / О.В. Волкова, Ю. К. Елецкий – М.: Медицина, 1982. – 298 с.

26. Горлова, Е.Е. Патология иммунитета при туберкулезе (обзор литературы) // Е.Е. Горлова / Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2010. – № 35. – С. 37-44.

27. Гутникова, А.Р. Эффективность коррекции морфофункциональных нарушений печени, индуцированных тяжелыми металлами / А.Р. Гутникова, Р.Ш. Мавлян-Ходжаев, Д.Д. Ашурова, Б.А. Саидханов, К.О. Махмудов, И.В. Косникова // Токсикологический вестник. – 2011. – № 1. (106) – С.14-16.

28. Давлетов, Э.Г. К анализу биохимического действия тяжелых металлов тиолопривные свойства ртути и кадмия / Э.Г. Давлетов, В.С. Сорокина // Труды Ленинградского санит.-гиг. мед. института. – 1979. – Т. 125. – С. 33-36.

29. Донник, И.М. Динамика накопления экотоксикантов в биологических ресурсах регионов с интенсивной антропогенной нагрузкой / И.М. Донник, И.А. Шкуратова, Э.И. Хасина, Е.В. Якубенко // Ветеринария Кубани. – 2012. – № 6. – С. 21-24.

30. Донник, И.М. Окружающая среда и здоровье животных / И.М. Донник, И.А. Шкуратова // Ветеринария Кубани. – 2011. – № 2. – С. 12-13.

31. Донник, И.М. Экологические аспекты животноводства промышленных регионах / И.М. Донник, И.А. Шкуратова, А.С. Кривоногова, А.Г. Исаева, А.А. Андрейко, Э.И. Хасина // Ветеринария Кубани. – 2010. – № 6. – С. 6-8.

32. Донченко, Н.А. Генетическое типирование микобактерий туберкулезного комплекса с помощью анализа ПДРФ ампликонов / Н.А. Донченко, А.С. Донченко, В.И. Семенихин // Ветеринарная патология. – 2004. – №1-2. – С.71-73.

33. Дорожкин, В.И. Комбинированное действие кадмия и цинка при поступлении в организм крыс с кормом / В.И. Дорожкин, Г.И. Павленко, М.Ю. Кроль, Д.А. Дроздов, В.О. Бондаренко, О.В. Мерзленко // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2012. – № 2 (8) – С. 79-81.

34. Дорожкин, В.И. Токсикологическое и санитарное значение тяжелых металлов / В.И. Дорожкин, М.Ю. Кроль // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2014. – № 2 (12) – С. 65-68.

35. Дмитруха, Н.Н. Изменения в иммунных органах крыс при субхронической интоксикации свинцом и кадмием / Н.Н. Дмитруха // Биологія тварин. – 2010. – Т. 12, № 2. – С. 403-408.

36. Дубовой, Б.Л. Применение РСЛЛ при дифференциальной диагностике туберкулиновых реакций / Б.Л. Дубовой, В.И. Добрелин // Ветеринарная патология. – 2012. – №3. – С. 56-59.

37. Дубовой, Б.Л. Диагностика неспецифических туберкулиновых реакций, вызванных атипичными и птичьими микобактериями / Б.Л. Дубовой, О.Н. Полякова // Ветеринария Кубани. – 2011. – №1. – С. 17-18.

38. Дюсембаева, Н.К. Анализ заболеваемости населения и определение ее взаимосвязи с факторами окружающей среды / Н.К. Дюсембаева, А.Е. Шпакова, Б.М. Салимбаева, Е.А. Дробченко // Научный альманах. – 2015. – №3 (5). – С. 132-138.

39. Жаксылыкова, А.К. Ультраструктурные изменения в клетках печени при хроническом экзотоксикозе кадмием / А.К. Жаксылыкова, Ы.А. Алмабаев, Н.Л. Ткаченко // Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в экономике, управлении проектами, педагогике, праве, культурологии, языкознании, природопользовании, биологии, зоологии, химии, политологии, психологии, медицине, философии, филологии, социологии, математике, технике, физике, информатике: мат. Междунар. науч.-практ. конф. – Санкт-Петербург: 2014. – С.60-61.

40. Жаксылыкова, А.К. Структурная перестройка лимфатического узла печени при хроническом экзотоксикозе кадмием / А.К. Жаксылыкова, Ы.А. Алмабаев, Н.Л. Ткаченко // Медицина и образование в Сибири. – 2014. – № 2 – С. 43-49.

41. Жапаркулова, Н.И. Содержание гормонов в крови лактирующих крыс при интоксикации солями тяжелых металлов и их коррекция / Н.И. Жапаркулова, А.Е. Ерназарова, З.Т. Рахмаева // Естественные и математические науки в современном мире. – 2015. – № 35 – С. 77-84.

42. Жоров, Г.А. Токсический иммунодефицит при скармливании кормов, содержащих радионуклиды и тяжелые металлы / Г.А. Жоров, П.Н. Рубченков, В.Н. Обрывин // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2011. – № 1. – С. 164-171.

43. Завалеева, С.М. Изменение селезенки кролика в возрастном аспекте / С.М. Завалеева, Н.Н. Садыкова, Е.Н. Чиркова // Вестник ОГУ. – 2011. – № 12 (131) – С. 71-73.

44. Завгородский, А.И. Воспроизведение паратуберкулеза у экспериментально инфицированных *M.avium Subsp. Paratuberculosis* (MAP) лабораторных животных / А.И. Завгородский, С.А. Позмогова, М.А. Гирка, П.А. Шутченко, Е.А. Медведь // Ветеринарная медицина. – 2014. – Т. 99 – С. 20-24.

45. Застенская, И.А. Изучение влияния полихлорированных бифенилов и тяжелых металлов на показатели иммунной системы в эксперименте / И.А. Застенская, Н.П. Пивень, В.В. Кочубинский, А.В. Кочубинский // Токсикологический вестник. – 2014. – № 2. – С. 28-31.

46. Застенская, И.А. Влияние интоксикации стойкими органическими загрязнителями и тяжелыми металлами на течение туберкулезной инфекции / И.А. Застенская, А.П. Лысенко, В.В. Кочубинский, А.В. Кочубинский // Токсикологический вестник. – 2014. – № 3. – С. 18-21.

47. Евглевский, А.А. Достижения и перспективы диагностики, профилактики и терапии туберкулеза / А.А. Евглевский, Д.А. Евглевский, А.М. Коваленко, В.А. Демин // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. – Т. 2. № 2. – С. 105-107.

48. Ежкова, А.М. Структурно-функциональные особенности печени и почек коров в зависимости от условий техногенной нагрузки / А.М. Ежкова, А.Х. Яппаров, М.С. Ежкова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2011. – Т. 207. – С. 231-236.

49. Еськов, Е.К. Атомно-адсорбционное и гистохимическое изучение аккумуляции свинца и кадмия растениями, произрастающими вблизи автомагистрали / Е.К. Еськов, М.Д. Еськова, Л.В. Серая // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2012. – № 2. – С. 62-63.

50. Еськов, Е.К. Накопление свинца и кадмия различными органами растений в зависимости от их удаленности от автомагистрали / Е.К. Еськов, М.Д. Еськова // Агрехимия. – 2013. – № 5. – С. 81-85.

51. Ерохин, В.В. Микробиологические методы диагностики туберкулеза: Эпидемиология туберкулеза. Характеристика возбудителя туберкулеза. Лабораторные методы диагностики туберкулеза: Теоретическое учебное пособие / Ерохин В.В., Голышевская В.И., Севастьянова Э.В., Шульгина М.В. – М.: Триада, 2008 – 40 с.

52. Ершов, Ю.А. Механизмы токсического действия неорганических соединений / Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева – М.: Медицина, 1989 – 272 с.

53. Ильязов, Р.Г. Адаптация агроэкоферы к условиям техногенеза / Под ред. чл.-корр. АН РТ Ильязова Р.Г. – Казань: «ФЭН», 2006 – с. 664.

54. Ионина, С.В. Взаимосвязь циркуляции атипичных микобактерий туберкулеза во внешней среде с проявлением туберкулиновых реакций у сельскохозяйственных животных / С.В. Ионина, Н.А. Донченко, А.С. Донченко // Инновации и продовольственная безопасность. – 2016. – №1 (11) – С. 41-44.

55. Исмаилова, С.И. Активность протеолитических ферментов в органах и тканях воблы (*Rutilus caspicus*) при воздействии солей тяжелых металлов / С.И. Исмаилова, А.Р. Исуев, П.М. Нурмагомедова // Токсикологический вестник. – 2011. – №3 (108) – С. 29-32.

56. Кадиков, И.Р. Токсикокинетика тяжелых металлов в организме животных при сочетанном отравлении диоксином и токсичными элементами / И.Р. Кадиков // Ветеринария и кормление. – 2015. – № 5 – С.26-27.

57. Кадиков, И.Р. Морфофункциональная характеристика крови животных при сочетанном отравлении диоксином и кадмием в малых дозах / И.Р. Кадиков // Ученые записки КГВАМ. – 2015. – Т. 222 (2). – С. 115-118.

58. Казимов, М.А. Изучение и гигиеническая оценка риска для здоровья от поступления тяжелых металлов в продуктах питания / М.А. Казимов, Н.В. Алиева // Казанский медицинский журнал. – 2014. – Т. 95, № 5 – С.706-709.

59. Киреев, Р.А. Влияние ионов кадмия на свободнорадикальные процессы и активность Na-K-АТФ-азы в тканях самок крыс / Р.А Киреев. // Токсикологический вестник. – 2005. – № 4. – С. 12-14.

60. Колобовникова, Ю.В. Показатели клеточного и гуморального иммунного ответа при туберкулезе легких, сопровождающемся эозинофилией / Ю.В. Колобовникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, К.О. Михеева, М.В. Игнатов, О.В. Филинюк, О.И. Новосельцева, Е.П. Степанова // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 1. – С. 39-45.

61. Колычев, Н.М. Экологические аспекты туберкулеза. / Н.М. Колычев, В.Н. Кисленко // Ветеринария. – 2014. – № 12. – С. 3-7.

62. Кондрахин, И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник / Под ред. проф. И.П. Кондрахина. – М.: КолосС, 2004 – 520 с.

63. Конюхова, В.А. Концентрация токсичных элементов в почве Юго-восточной зоны Республики Татарстан / В.А. Конюхова, К.Х. Папуниди, М.В. Кузина, М.Я. Трemasов // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2012. – № 2 – С. 123-127.

64. Конюхова, В.А. Фармако-токсическое обоснование применения натрия сульфида при отравлениях животных солями тяжелых металлов: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Конюхова Валентина Александровна. – Казань, 2001. – 22 с.

65. Котельникова, С.В. Сезонные и половые особенности гравиметрических показателей эндокринных и иммунных органов в условиях кадмиевой интоксикации / С.В. Котельникова, Д.Л. Теплый, А.В. Котельников, М.В. Каргина, Г.А. Шараева // Экспериментальная физиология, морфология и медицина. – 2011. – № 4 (37) – С. 103-109.

66. Кощеев, Н.Н. Определение аллергизирующих свойств атипичных микобактерий / Н.Н. Кощеев, В.Ф. Бордюг, В.Г. Ощепков, А.Д. Панкратова, А.Д. Слепченко // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – № 12. – С. 59-60.

67. Кривоногова, А.С. Физиологические и иммунологические показатели животных при накоплении повышенных концентраций тяжелых металлов в их органах и тканях. / А.С. Кривоногова, А.Г. Исаева, А.А. Баранова // Аграрный вестник Урала. – 2013. – № 6 (112). – С.15-20.

68. Кряжев, Д.А. Комплексная оценка не канцерогенного риска на здоровье населения моногородов и сельских поселений от воздействия загрязняющих химических веществ / Д.А. Кряжев, М.В. Боев, Л.М. Тулина // Альманах молодой науки. – 2015. – № 3. – С. 3-8.

69. Куршакова, Е.И. Биохимические показатели крови бычков и их продуктивность при отравлении тяжелыми металлами и применении сорбентов / Е.И. Куршакова, Р.У. Бикташев, К.Х. Папуниди, И.Р. Кадиков // Актуальные проблемы сельского хозяйства горных территорий: мат. V-й Междунар. науч.-практ. конф. – Горно-Алтайск: РИО ГАГ – 2015. – С. 89-91.

70. Лисунова, Л.И. Использование ионов кальция для снижения аккумуляции кадмия в органах и тканях перепелов / Л.И. Лисунова, В.С. Токарева, И.А. Кормилицин // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2011. – № 4. – С. 52-53.

71. Лоретц, О.Г. Состояние здоровья и молочная продуктивность коров в промышленных регионах / О.Г. Лоретц, М.И. Барашкин // Ветеринарная патология. – 2012. – Т. 40, № 2. – С. 113-115.

72. Лукин, С.В. Оценка содержания кадмия, свинца, ртути и мышьяка в агроценозах лесостепной зоны ЦЧО / С.В. Лукин, Н.С. Четверикова // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2013. – № 5. – С.18-21.

73. Маянский, А.Н. Микобактерии: туберкулез и микобактериозы. / А.Н. Маянский. – Н.Новгород Издательство Нижегородской государственной медицинской академии, 2000. – 74 с.

74. Минеев, В.Г. Влияние последействия систем удобрения на барьерные функции растений ячменя на дерново-подзолистой почве, загрязненной свинцом и кадмием / В.Г. Минеев, Л.А. Лебедева, А.В. Арзамазова // Агрехимия. – 2009. – № 9. – С. 60-68.

75. Мирзоев, Э.Б. Ответная реакция организма крыс (поколение F₁) при хроническом воздействии малых доз кадмия в антенатальный период развития / Э.Б. Мирзоев, В.О. Кобялко, О.А. Губина, Н.А. Фролова // Токсикологический вестник. – 2014. – № 4. – С. 29-33.

76. Найманов, А.Х. Анализ изменений эпизоотической ситуации и государственных оздоровительных мероприятий при туберкулезе КРС в РФ / А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко, Е.П. Вангели, С.А. Коломыцев, Н.М. Ткач // Ветеринария и кормление. – 2013. – № 4. – С. 51-53.

77. Найманов, А.Х. Особенности патологоанатомической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко, Е.П. Вангели, М.И. Гулюкин, Н.К. Букова // Ветеринария. – 2015. – № 11. – С. 13-16.

78. Найманов, А.Х. Проблема неспецифических реакций на туберкулин и совершенствование симульатной пробы для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / А.Х. Найманов, Г.И. Устинова, Н.Г. Толстенко, Е.П. Вангели, О.Д. Кучерук // Ветеринария. – 2015. – № 6. – С. 20-25.

79. Найманов, А.Х. ПЦР на современном этапе борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота / А.Х. Найманов, Е.П. Вангели, Н.Г. Толстенко, М.С. Калмыкова // Ветеринария. – 2016. – № 2. – С. 20-23.

80. Найманов, А.Х. Сенсibiliзирующие свойства быстрорастущих нетуберкулезных микобактерий 4-й группы по классификации Раньона / А.Х. Найманов, Г.И. Устинова, Н.Г. Толстенко, Е.П. Вангели, О.Д. Кучерук // Ветеринария. – 2015. – № 2. – С. 23-27.

81. Новиков, Д.К. Оценка иммунного статуса / Д.К. Новиков, В.И. Новикова – М. Медицина. – 1996. – 281 с.

82. Новиков, В.А. Техногенное воздействие тяжелых металлов. / В.А. Новиков, М.Я. Трemasов // Ветеринария. – 2004. – № 11. – С. 51-55.

83. Новицкий, В.В. Роль регуляторных Т-клеток и эозинофилов в механизмах иммунного ответа при туберкулезе легких / В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, Ю.В. Колобовникова, Коновалова Т.Е., Воронкова О.В. // Иммунология. – 2012. – № 4. – С. 184-188.

84. Норматова, Ш.А. Актуальные проблемы экологии и здоровья населения в Узбекистане / Ш.А. Норматова, М.Д. Ашурова, Г.А. Эрматова, Х.О. Хожиматов, Г.Н. Султонов, У.А. Болтабоев // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2014. – №5-2. – С. 208-211.

85. Никифорова, Т.Е. Биологическая безопасность продуктов питания: учеб. пособие / Т.Е. Никифорова – Иваново: ГОУ ВПО Иван. гос. хим.-технол. ун-т., 2009. – 179 с.

86. Овдиенко, Н.П. Туберкулез как международная и национальная медико-ветеринарная проблема в современных условиях. / Н.П. Овдиенко, А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко, В.Н. Хруленко, Н.А. Яременко, П.П. Рахманин, Н.В. Мельник, С.В. Крюков, В.Н. Боровой // Ветеринарный врач. – 2009. – № 2. – С. 14-17.

87. Онищенко, Г.Г. Химическая безопасность – важнейшая составляющая санитарно-эпидемиологического благополучия населения. / Г.Г. Онищенко // Токсикологический вестник. – 2014. – № 1 (124). – С. 2-3.

88. Онищенко, Г.Г. Эпидемиологическая ситуация в Российской Федерации и меры по ее стабилизации. / Г.Г. Онищенко // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2003. – № 11. – С.4-9.

89. Ощепков, В.Г. Дифференциальная диагностика туберкулеза с применением хемилюминесцентного метода / В.Г. Ощепков, Л.А. Таллер, Г.М. Дюсенова, Т.А. Вассимирская, Е.Ю. Секин // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – № 12. – С. 41-44.

90. Ощепков, В.Г. Культурально-генетический метод диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / В.Г. Ощепков, Л.А. Таллер, Е.Ю. Секин, Т.А. Вассимирская, А.Д. Слепченко // Достижения науки и техники АПК. – 2010. – № 5. – С. 64-65.

91. Ощепков, В.Г. О роли диких, синантропных и мелких домашних животных в резервации и распространении микобактерий туберкулеза. / В.Г. Ощепков, В.Ф. Бордюк, Н.Н. Кощеев, А.Д. Панкратова, А.Г. Гардер // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – № 2. – С. 74-76.

92. Ощепков, В.Г. Основные пути оптимизации мероприятий при туберкулезе животных / В.Г. Ощепков // Ветеринарная патология. – 2004. – № 1-2. – С. 34-38.

93. Ощепков, В.Г., Характеристика L-форм микобактерий, выделенных на территории Западной Сибири и Южного Урала / В.Г. Ощепков, Л.А. Таллер, Л.В. Галатова, Т.Д. Абдыраманова, Е.Ю. Секин, Г.М. Дюсенова // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2007. – № 4. – С. 99-102.

94. Папуниди, К.Х. Эффективность лекарственных средств при сочетанном отравлении белых крыс диоксином и кадмия хлоридом / К.Х. Папуниди, А.В. Иванов, И.Р. Кадиков, М.Я. Трemasов // Аграрный вестник Урала. – 2012. – № 5 (97). – С. 48-49

95. Першикова, Н.Л. Использование полимеразной цепной реакции для обнаружения туберкулеза / Н.Л. Першикова, Н.А. Донченко // Вестник КрасГАУ. – 2007. – №5. – С. 129-131.

96. Перельман, М.И. Фтизиатрия. Национальное руководство / под ред. М.И. Перельмана – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 512 с.
97. Петров, Р.В. Оценка иммунного статуса человека при массовых обследованиях. Методические рекомендации для научных работников и врачей практического здравоохранения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 1993. – № 6. – С. 51-62.
98. Прокопьева, Н.И. Особенности контроля эпизоотического процесса туберкулеза крупного рогатого скота в экстремальных условиях Якутии: автореф. дисс. ... док. вет. наук / Прокопьева Нелли Ильинична. – Новосибирск, 2004. – 35 с.
99. Романенко, В.Ф. Эпизоотолого-эпидемиологические особенности микобактерий туберкулеза / В.Ф. Романенко // Ветеринария. – 2013. – № 7. – С. 23-28.
100. Романенко, В.Ф. Генетическая обусловленность адаптивной изменчивости микобактерий туберкулеза / В.Ф. Романенко // Ветеринария. – 2006. – № 12. – С. 23-25.
101. Садовников, Н.В. Морфологические изменения у цыплят под действием тяжелых металлов / Н.В. Садовников, Е.А. Фесенко, Н.А. Кольберг, В.Н. Байматов // Ветеринария. – 2011. – № 10. – С. 52-53.
102. Салина, Т.Ю. Иммунологические аспекты туберкулезной инфекции / Т.Ю. Салина, Т.И. Морозова // Цитокины и воспаление. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 5-10.
103. Салина, Т.Ю. Особенности продукции цитокинов у больных туберкулезом легких / Т.Ю. Салина, Т.И. Морозова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 3. – С. 18-20.
104. Салина, Т.Ю. Особенности иммунного ответа у больных туберкулезом и саркоидозом / Т.Ю. Салина // Теоретические и прикладные аспекты современной науки. – 2015. – № 7. – С. 50-52.

105. Сахно, Л.В. Роль PD-1/B7-H1-опосредованного пути в нарушении антигенспецифического ответа у больных туберкулезом легких / Л.В. Сахно, М.А. Тихонова, О.Ю. Леплина, Т.В. Тыринова, С.Д. Никонов, О.А. Жданов, А.А. Останин, Е.Р. Черных // Иммунология. – 2011. – № 2. – С. 90-93.

106. Скрыпкин, А.В. Изучение этиологических факторов реакции на туберкулин у крупного рогатого скота / А.В. Скрыпкин, В.Г. Скрыпкин, А.И. Завгородний, Б.Т. Стегний, С.А. Позмогова // Ветеринария. – 2011. – № 4. – С. 27-30.

107. Слепцов, И.В. Влияние экстрактов Шлемника обыкновенного, Горца птичьего и Щитовника пахучего на мышей при хроническом отравлении хлоридом кадмия (II) / И.В. Слепцов, Е.Р. Поскачина, И.В. Воронов // Ветеринария. – 2015. – № 11. – С. 55-57.

108. Слогацкая, Л.В. Чувствительность и специфичность диаскинтеста при внелегочной локализации туберкулеза у больных с ВИЧ-инфекцией и без нее / Л.В. Слогацкая, А.В. Филипов, Я.А. Кочетков, П.П. Сельцовский, В.И. Литвинов // Иммунология. – 2011. – № 3. – С. 116-119.

109. Смирнов, А.М. Актуальные вопросы ветеринарно-санитарных мероприятий на территориях, загрязненных экотоксикантами / А.М. Смирнов, В.И. Дорожкин, П.Н. Рубченко // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2010. – № 2. – С. 1-10.

110. Смирнов, А.М. Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных / А.М. Смирнов // Ветеринарная патология. – 2004. – № 1-2. – С. 10-13.

111. Смирнов, А.М. Ускоренные методы дифференциации микобактерий и их диагностическое значение в борьбе с туберкулезной инфекцией / А.М. Смирнов, В.М. Карташова // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2012. – № 2 (8). – С. 1-10.

112. Софронов, П.В. Токсикологическая оценка сочетанного воздействия кадмия хлорида и Т-2 токсина на животных и применение бентонита в качестве лечебно-профилактического средства: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Софронов Павел Владимирович. – Казань, 2009. – 22 с.

113. Софронова, С.А. Изыскание средств для лечения животных при сочетанном отравлении солями свинца и кадмия: дис. ...канд. биол. наук.: 16.00.04 / Софронова Светлана Анатольевна. – Казань, 2008. – 158 с.

114. Сошникова, Е.М. Динамика биохимических показателей в сыворотке крови мелкого рогатого скота при экспериментальном заражении туберкулезом и паратуберкулезом: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Сошникова Екатерина Михайловна. – Москва, 2016. – 22 с.

115. Старкова, Д.А. *Mycobacterium avium* – актуальный возбудитель микобактериоза человека / Д.А. Старкова // Инфекция и иммунитет. – 2013. – № 1. – С. 7-14.

116. Степанова, Е.В. Развитие адаптационных механизмов у самок белых крыс в ответ на воздействие ионов кадмия / Е.В. Степанова, О.В. Слюзова, А.Б. Бучарская, Р.А. Киреев, В.В. Игнатов // Токсикологический вестник. – 2008. – № 3. – С. 23-27.

117. Стребкова, З.В. Влияние экологических условий на качество продуктов животноводства / З.В. Стребкова, Н.В. Онистратенко, И.Н. Пенькова // Известия Нижневолжского Агроуниверситетского комплекса. – 2011. – № 3 (23). – С. 146-151.

118. Таллер, Л.А. Совершенствование лабораторной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / Л.А. Таллер, В.Г. Ощепков, Е.Ю. Секин, Т.А. Янченко // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 9. – С. 67-69.

119. Тен, Э.В. Экспресс-метод определения активности церулоплазмينا в сыворотке крови / Э.В. Тен // Лаб. дело. – 1981. – № 6. – С. 334-335.

120. Ткаченко, Е.А. Влияние α -токоферола и наночастиц серебра на морфологический состав крови мышей при экспериментальной кадмиевой интоксикации / Е.А. Ткаченко, М.А. Дерхо // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2015. – № 1 (51). – С. 84-87.

121. Тукмакова, Р.М. Скорость восстановления качества пресных вод при расформировании очагов загрязнения, связанных с нефтедобычей в Республике Татарстан / Р.М. Тукмакова, Д.А. Семанов, В.З. Латыпова, Ю.П. Бубнова, Н.С. Гатиятуллин // Вестник Татарстанского отделения Российской экологической академии. – 2006. – № 1. – С. 60-68.

122. Тупота, Н.Л. Методы молекулярной биологии и их использование в диагностике туберкулеза животных / Н.Л. Тупота, С.Г. Тупота, Н.А. Донченко // Ветеринария. – 2012. – № 3. – С. 26-30.

123. Фокин, В.А. Результаты оценки безопасности алиментарного поступления кадмия с использованием эпидемиологических и клинических данных / В.А. Фокин, Н.Г. Атискова / Медицина труда и экология человека. – 2015. – № 3. – С. 221-226.

124. Харитонов, В.И. Задачи гигиены и экологии применительно к проблеме экологически обусловленной заболеваемости / В.И. Харитонов // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2015. – № 2. – С.137-145.

125. Хисматуллина, Н.А. Сравнительное изучение активности субъединичных антигенов в полном лизате *M.tuberculosis H37RV* и *M.bovis Bovinus-8* в иммуноферментном анализе / Н.А. Хисматуллина, К.С. Хаертынов, Э.А. Шуралев, А.М. Гулюкин, М.Н. Мукминов, А.Р. Валеева, А.В. Москивева // Биотехнология: реальность и перспективы: матер. Междунар. науч.-практ. конф. – Саратов: ИЦ «Наука», 2014. – С. 215-218.

126. Хисматуллина, Н.А. Использование антигенов микобактерий *M.bovis* BCG-1, *M.bovis* -8 и *M.bovis* Vallee-88 для иммуноферментного анализа сывороток крови крупного рогатого скота / Н.А. Хисматуллина, К.С. Хаертынов, Э.А. Шуралев, А.М. Гулюкин, А.Х. Найманов, Р.М. Ахмадеев, М.Н. Мукминов, А.Р. Валеева // Труды ВИЭВ. – 2013. – Т. 77. – С. 200-203.

127. Хисматуллина, Н.А. Сравнительная оценка эффективности схем иммунизации кроликов для получения диагностических сывороток при туберкулезе / Н.А. Хисматуллина, А.М. Гулюкин, Э.А. Шуралев, К.С. Хаертынов, Р.М. Ахмадеев // Биотехнология: реальность и перспективы: мат. Междунар. науч.-практ. конф. – Саратов, 2014. – С. 218-219.

128. Хисматуллина, Н.А. Использование комбинации антигенов из *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG и ППД при диагностике легочной формы туберкулеза иммуноблотингом / Н.А. Хисматуллина, К.С. Хаертынов, Э.А. Шуралев, А.М. Гулюкин, Р.М. Ахмадеев, Н.В. Волобуева, М.Н. Мукминов, А.Р. Валеева, А.В. Москвичева // Современные достижения ветеринарной медицины и биологии – в сельскохозяйственное производство: матер. II Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Уфа: Башкирский ГАУ, 2014. – С. 135-138.

129. Цибулькин, А.П. Скрининг диагностического потенциала нативных белковых фракций *Micobacterium tuberculosis* методом иммуноблотинга / А.П. Цибулькин, И.М. Хаертынова, Н.Г. Уразов, К.С. Хаертынов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61. № 2. – С. 90-102.

130. Цибулькин, А.П. Диагностическая значимость метода ИФА для определения противотуберкулезных антител в группах ВИЧ-положительных и отрицательных пациентов / А.П. Цибулькин, И.М. Хаертынова, С.В. Герасимова, К.С. Хаертынов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 12. – С. 41-44.

131. Четверикова, Н. С. Кадмий в агроландшафтах лесостепной зоны. / Н. С. Четверикова, Л. В. Марциневская // Достижения науки и техники АПК. – 2013. – № 7. – С. 69-70.

132. Чопикашвили, Л.В. Модифицирующий эффект комплекса биологически активных веществ хвоща полевого (*Equisetum arvense* L.) на фоне воздействия свинца (Pb (II)) и топинамбура (*Helianthus tuberosus*) на фоне кадмия (Cd (II)) в ряде тест-систем (*Drosophila melanogaster*) и в клетках костного мозга млекопитающих (крыс линии Wistar) / Л.В. Чопикашвили, М.С. Зангиева, З.В. Гагкаева, Е.Г. Пухаева, Ж.Г. Фарниева // Известия Горского государственного аграрного университета. – 2012. – Т. 49., № 1-2. – С. 414-417.

133. Чурина, Е.Г. Иммуносупрессорные эффекты Т-регуляторных клеток при инфильтративном туберкулезе легких / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, А.Е. Колосова, Е.В. Сионина, О.В. Филинчук, О.В. Воронкова, И.О. Наследникова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 4. – С. 26-29.

134. Шкаева, Н.А. Распространение туберкулеза крупного рогатого скота на Южном Урале. / Н.А. Шкаева // Ветеринарный врач. – 2010. – № 4. – С. 16-18.

135. Шкуратова, И.А. Эколого-биологические особенности крупного рогатого скота в условиях техногенеза / И.А. Шкуратова, И.М. Донник, А.Г. Исаева, А.С. Кривоногова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – № 2. – С. 366-369.

136. Шорникова, Н.И. Влияние кадмия на активность церулоплазмينا и АСТ сыворотки крови крыс / Н.И. Шорникова, Н.Н. Судакова, Ю.В. Конопатов, С.В. Васильева // Международный вестник ветеринарии. – 2013. – № 3. – С. 64-67.

137. Шумакова, А.А. Токсичность кадмия при его совместном введении с диоксидом титана (рутил), наноструктурным диоксидом кремния и фуллеренолом / А.А. Шумакова, Э.Н. Трушина, О.К. Мустафина, С.Х. Сото, Г.Ю. Мальцев, И.В. Гмошинский, С.А. Хотимченко // Профилактика и клиническая медицина. – 2015. – № 1 (54). – С. 86-93.

138. Шуралев, Э.А. Биохимические показатели сыворотки крови кроликов при патогенезе туберкулеза на фоне интоксикации хлоридом кадмия / Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, А.Р. Валеева, Р.М. Ахмадеев, З.З. Алеева, К.С. Хаертынов // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2016. – № 4 (20). – С. 98-106.

139. Шуралев, Э.А. К вопросу серологической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / Э.А. Шуралев, Э.В. Ндайишимийе, М.Н. Мукминов // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2012. – Т. 211. – С. 202-206.

140. Шуралев, Э.А. Кадмий индуцированные изменения свойств микобактерий / Э.А. Шуралев, А.Р. Валеева, М.Н. Мукминов // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2016. – Т. 226, № 2. – С. 177-181.

141. Шуралев, Э.А. Мультиплексный ИФА с хемилюминесцентной меткой для диагностики туберкулеза у кабанов / Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, А.Р. Валеева, А.А. Васин, А.В. Иванов, К. Велан // Ветеринария. – 2013. – № 2. – С. 25-28.

142. Шуралев, Э.А. Рекомбинантные белки и синтетические пептиды для диагностики туберкулезной инфекции / Э.А. Шуралев, Н.А. Хисматуллина, М.Н. Мукминов, А.Р. Валеева, К. Велан // Матер. IV Межд. Казанского инновационного нанотехнологического форума – Казань, 2012. – С. 287-289.

143. Шуралев, Э.А. Перспективы применения мультиплексных иммуноаналитических тест-систем / Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, А.Н. Чернов, Г.Г. Казарян, А.Р. Валеева, Н.А. Хисматуллина // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК: матер. Межд. науч.-практ. конф. – Щелково, 2012. – С. 21-27.

144. Шуралев, Э.А. Сравнительный анализ тест-систем для диагностики туберкулеза у альпак. / Э.А. Шуралев // Ветеринарный врач. – 2012. – № 5. – С. 30-33.

145. Эйхлер, В.Д. Яды в нашей пище: Взрывная волна токсикантов окружающей среды в пищевых цепях. / В.Д. Эйхлер – М.: Мир, 1986. – 202 с.

146. Якупов, Т.Р. Иммуноблот анализ в диагностике туберкулеза / Т.Р. Якупов, К.С. Хаертдинов // Ветеринарный врач. – 2011. – № 1. – С. 29-31.

147. ГОСТ 4330-76 Реактивы. Кадмий хлористый 2,5-водный. Технические условия. – М.: ИПК Издательство Стандартов, 2001. – 11 с.

148. ГОСТ 30178-96 Сырье и продукты пищевые. Атомно-адсорбционный метод определения токсичных элементов. – М.: Стандартинформ, 2010. – 10 с.

149. Наставление по диагностике туберкулеза животных: утв. департа. ветеринарии. – М.: Сельскохозяйственные технологии, 2002. – 60 с.

150. О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации [Текст]: Приказ от 21 марта 2003 г. № 109 // Министерство здравоохранения Российской Федерации. – 2003. – С. 244.

151. О заболеваемости туберкулезом в Российской Федерации [Текст]: Письмо от 6 августа 2013 г. № 01/8843-13-32 [Электронный ресурс] / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. <http://rosпотребнадзор.ru/documents>.

152. Пат. **2390559** Рос. Федерация, МПК С12N7/00 Способ получения антигена из *Micobacterium tuberculosis* / И.М. Хаертынова, А.П. Цибулькин, Р.Ш. Валиев, О.М. Романенко, К.С. Хаертынов, Н.Г. Уразов; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО Казанский государственный медицинский университет. – № 2008141939/13; заявл. 22.10.2008; опубл. 27.05.2010.

153. Правила ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов: утв. Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 27.12.1983 [Электронный ресурс] / Россельхознадзор. <http://www.fsvps.ru/fsvps/laws/1107.html>

154. СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002. – 44 с.

155. Adiel, R.C. Cadmium- and calcium-mediated toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in vivo: Interaction on fitness and mitochondrial endpoints / R.C. Adiel, D. Stevens, C. Kamunde // *Chemosphere*. – 2011. – V. 85, № 10. – P. 1604-1613.

156. Afridi, H.I. Evaluation of arsenic, cadmium, lead, nickel, and zinc in biological samples (scalp hair, blood, and urine) of tuberculosis and diarrhea male human immunodeficiency virus patients / H.I. Afridi, T.G. Kazi, N. Kazi, G.A. Kandhro, A.Q. Shah, J.A. Baig, S. Khan, N.F. Kolachi, S.K. Wadhwa, F. Shah // *Clinical Laboratory*. – 2011. – V. 57, №11-12. – P. 867-878.

157. Al Bakheet, S.A. Effect of long-term human exposure to environmental heavy metals on the expression of detoxification and DNA repair genes / S.A. Al Bakheet, I.M. Attafi, Z.H. Maayah, A.R. Abd-Allah, Y.A. Asriri, H.M. Korashy // *Environmental Pollution*. – 2013. – V. 181. – P. 226-232.

158. Alinovi, C.A. Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* / C.A. Alinovi, M.P. Ward, Lin Tsang Long, G.E. Moore, Wu Ching Ching // *Veterinary Microbiology*. – 2009. – V. 136, № 1-2. – P. 177-179.

159. Aurtenetxe, O. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against *Mycobacterium bovis* in European wild boar. / O. Aurtenetxe, M. Barral, J. Vicente, J. de la Fuente, C. Gortázar, R. A Juste // *BMC Veterinary Research*. – 2008. – № 4. – P. 43.

160. Bailey, G.S. The production of antisera / G.S. Bailey // *Methods in Molecular Biology*. – 1984. – V. 1. – P. 295-300.

161. Barnes, P.F. Cytokine production induced by *Mycobacterium* lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure / P.F. Barnes, D. Chatterjee, J.S. Abrams, S. Lu, E. Wang, M. Yamamura, P.J. Brennan, R.L. Modlin // *Journal of Immunology*. – 1992. – V. 149, № 4. – P. 541-547.

162. Bezos, J. Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals / J. Bezos, L. Juan, B. Romero, J. Alvarez, F. Mazzucchelli, A. Mateos, L. Dominguez, A. Aranaz // *Veterinary Immunology & Immunopathology*. – 2010. – V. 133, № 2-4. – P. 269-275.

163. Berche, P. Susceptibility of mice to bacterial infections after chronic exposure to cadmium / P. Berche, M. Simonet, M. Thévenin, J.L. Fauchère, J.J. Prat, M. Véron // *Annals of Microbiology (Paris)*. – 1980. – V. 131B, № 2. – P. 145-151.

164. Bermudez, L.E. Mechanisms of *Mycobacterium avium* pathogenesis / L.E. Bermudez, D. Wagner, D. Sosnowska // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. – 2000. – V. 48, № 6. – P. 521-527.

165. Bodnar, K.A. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells / K.A. Bodnar, N.V. Serbina, J.L. Flynn // *Infection and Immunity*. – 2001. – V. 69. – P. 800-809.

166. Bozelka, B.E. Increased mortality of cadmium-intoxicated mice infected with the BCG strain of *Mycobacterium bovis* / B.E. Bozelka, P.M. Burkholder // *Journal of the Reticuloendothelial Society*. – 1979. – V. 26, № 3. – P. 229-237.

167. Bozelka, B.E. Cadmium, a metallic of antibody-mediated immunity in mice / B.E. Bozelka, P.M. Burkholder, L.W. Chang Cadmium // *Environmental Research*. – 1978. – V. 17, № 3. – P. 390-402.

168. Borisova, T. Presynaptic malfunction: The neurotoxic effects of cadmium and lead on the proton gradient of synaptic vesicles and glutamate transport / T. Borisova, N. Krisanova, R. Sivko, L. Kasatkina, A. Borisov, S. Griffin, M. Wireman // *Neurochemistry International* – 2011. – V. 59, № 2. – P. 272-279.

169. Braude, G.L. Cadmium and lead content of soybean products. / G.L. Braude, A.M. Nash, W.J. Wolf, R.L. Carr, R.L. Chaney // *Journal of Food Science*. – 1980. – V. 45. № 5. – P. 1187-1189.

170. Chatterjee, D. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects / D. Chatterjee, K.-H. Khoo // *Glycobiology*. – 1988. – V. 8, № 2. – P. 113-120.

171. Elsenhans, B. G. Longitudinal pattern of digestive and absorptive function in the small intestine of rats after dietary exposure to cadmium chloride. / B. Elsenhans, G. Hunder, G. Strugala // *Physiological Research*. – 1996. – V. 5. – P. 438.

172. Etchechoury, L. Molecular typing of *Micobacterium bovis* isolates in Argentina: First description of a person-to-person transmission case / L. Etchechoury, G. Echeverria Valencia, N. Morcillo, M.D. Sequeira B., Imperiale, M. Lopez, K. Caimi, M.J. Zumarraga, A. Cataldi, M.I. Romano // *Zoonoses and Public Health*. – 2010. – V. 57, № 6. – P. 375-381.

173. Ghazaly, K.S. Hematological and physiological response to sublethal concentrations of cadmium in a freshwater teleost *Tilapia zillii* / K.S. Ghazaly // *Water, Air and Soil Pollution*. – 1992. – V. 64. – P. 551-559.

174. Gortazar, C. Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. / C. Gortazar, J. Vicente, M. Boadella, C. Ballesteros, R.C. Galindo, J. Garrido, A. Aranaz, J. de la Fuente // *Veterinary Microbiology*. – 2011. – V. 151, № 1-2. – P. 170-178.

175. Griem, P. Metal Ion induced autoimmunity / P. Griem, E. Gleichmann // *Current Opinion in Immunology*. – 1995. – V. 6. – P. 831-838.

176. Harari, A. Dominant TNF- α ⁺ Mycobacterium tuberculosis-specific CD4⁺T cell responses discriminate between latent infection and active disease / A. Harari, V. Rozot, F.B. Enders, M. Perreau, J.M. Stalder, L.P. Nicod, M. Cavassini, T. Calandra, C.L. Blanchet, K. Jatton, M. Faouzi, C.L. Day // *Nature*. – 2011. – V. 17, № 3. – P. 372-376.

177. Hernandez, C. Tuberculosis in the age of biologic therapy / C. Hernandez, A.S. Cetner, J.E. Jordan, S.N. Puangsuwan, J.K. Robinson // *Journal of the American of Dermatology*. – 2008. – V. 59. – P. 363-380.

178. Hurtenbach, U. Modulation of murine T and B cell reactivity after short-term cadmium exposure in vivo / U. Hurtenbach, J. Oberbarhnsheidt // *Archives of Toxicology*. – 1988. – V. 1. – P. 22-28

179. Hotter, G.S. Identification of a cadmium-induced gene in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* / G.S. Hotter, T. Wilson, D.M. Collins // *FEMS Microbiology Letters*. – 2001. – V. 200, № 2. – P. 151-155.

180. Houghton, R.L. Use of Multi-epitope Polyproteins in Serodiagnosis of Active Tuberculosis / R.L. Houghton, M.J. Lodes, D.C. Dillon, L.D. Reynolds, C.H. Day, P.D. McNeill, R.C. Hendrickson, Y.A. Skeiky, D.P. Sampaio, R. Badaro, K.P. Lyashchenko, S.G. Reed // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. – 2002. – V. 9, № 4. – P. 883-891.

181. Institoris, L. Immunotoxicological examination of repeated dose combined exposure by dimethoate and two heavy metals in rats / L. Institoris, O. Siroki, I. Desi, Ü. Ünder // *Human and Experimental Toxicology*. – 1999. – V. 18, № 2 – P. 88-94.

182. Laemmli, U.K. Cleavage structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – V. 227. – P. 680-685.

183. Lacorte, L.M. Early changes induced by short-term low-dose cadmium exposure in rat ventral and dorsolateral prostates / L.M. Lacorte, F.K. Delella, E.M. Porto Amorim, L.A. Justulin, A.F. Godinho, A.A. Almeda, P.F. Pinheiro, R.L. Amorim, S.L. Felisbino // *Micrascopy Research and Technique* – V. 74, № 11. – P. 988-997.

184. Lappenbusch, W.L. Effect of cadmium chloride on the radiation response of the adult rat / W.L. Lappenbusch, J.D. Gile // *Radiation Research*. – 1975. – V. 62, № 2. – P. 313-322.

185. Lengyel, Z. Neurotoxic and general effects of combined subchronic exposure of rats to insecticides and heavy metals / Z. Lengyel, A. Lukács, A. Szabó, L. Institoris // *Acta Biologica Hungarica*. – 2006. – V. 57, № 4. – P. 423-432.

186. Lyashchenko, K.P. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases / K.P. Lyashchenko, M. Sing, R. Colangeli, M.L. Genaro // *Journal of immunological methods*. – 2000. – V. 242. – P. 91-100.

187. Lyashchenko, K.P. Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. / K.P. Lyashchenko K.P. Lyashchenko, R. Greenwald, J. Esfandiari, M.A. Chambers, J. Vicente, C. Gortazar, N. Santos, M. Correia-Neves, B.M. Buddle, R. Jackson, D.J. O'Brien, S. Schmitt, M.V. Palmer, R.J. Delahay, W.R. Waters // *Veterinary Microbiology*. – 2008. – V. 132, № 3-4. – P. 283-292.

188. Mattila, J.T. Simian immunodeficiency virus-induced changes in T cell cytokine responses in cynomolgus macaques with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection are associated with timing of reactivation / J.T. Mattila, C.R. Diedrich, P. Ling Lin, J. Phuah, J.L. Flynn // *Journal of Immunology*. – 2011. – V. 186, № 6. – P. 3527-3537.

189. Michael, D.I. A Clinicians Guide to Tuberculosis. / D.I. Michael – Lippincott Williams & Wilkins, 2000. – p. 460.

190. McNieil, M.R. Structure, function, and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance: some thoughts and possibilities arising from recent structural. / M.R. McNieil, P.J. Brennan // *Research in Microbiology*. – 1991. – V. 142. – P. 451-463.

191. Mehra, R. Hair as an indicator for assessing adverse effect of cadmium on human health / R. Mehra, M. Juneja // *Journal of Environmental Science and Engineering*. – 2005. – V. 47, № 1. – P. 59-64.

192. Muse Davis, J. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection / J. Muse Davis, L. Ramakrishnan // *Cell*. – 2009. – V. 136, № 1. – P. 37-49.

193. Nugent, G. Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host wildlife complexes: a New Zealand case study. / G. Nugent // *Veterinary Microbiology*. – 2011. – V. 151, № 1-2. – P. 34-42.

194. Zanardi, G. Tuberculosis transmission by *Mycobacterium bovis* in a mixed cattle and goatherd / G. Zanardi, M.B. Boniotti, A. Gaffuri, B. Casto, M. Zanoni, M.L. Pacciarini // *Research in Veterinary Science* – 2013. – V. 95, № 2. – P. 430-433.

195. Palmer, M.V. Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis* / M.V. Palmer, W.R. Waters, T.C. Thacker // *Veterinary Pathology*. – 2007. – V. 44, № 6. – P. 863-874.

196. Petrovic, Z. Cadmium and mercury accumulation in European hare (*Lepus europaeus*): age-dependent relationships in renal and hepatic tissue / Z. Petrovic, V. Teodorović, S. Djurić, D. Milićević, D. Vranić, M. Lukić // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2014. – V. 21, № 4. – P. 14058-14068.

197. Raju, B. Significance of respiratory isolates of *Mycobacterium avium* complex in HIV-positive and HIV-negative patients / B. Raju, N.W. Schluger // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2000. – V. 4, № 3. – P. 134-139.

198. Renugadevi, J. Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats / J. Renugadevi, S.M. Prabu // *Toxicology*. – 2009. – V. 256, № 1-2. – P. 128-134.

199. Runyon, E.H. *Mycobacterium* / E.H. Runyon, A.G. Karlson, G.P. Kubica, L.G. Wayne // *Manual of clinical microbiology*. 2nd ed. Washington: Amer. Soc. Microbiol. – 1981. – P. 150-179.

200. Russell, D.G. *Mycobacterium tuberculosis* and the intimate discourse of a chronic infection / D.G. Russell // *Immunology Reviews*. – 2011. – V. 240, № 1. – P. 252-268.

201. Rovatti, E. Evaluation of a western blot serum test for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection / E. Rovatti, M.P. Corradi, M. Amicosante, P.L. Tartoni, W. Panini, A. Ancora, A.M. Cenci, L. Zucchi, L. Monno, G. Angarano, C. Saltini // *European Respiratory Journal*. – 1996. – V. 9, № 2. – P. 288-292.

202. Satoru, D. Gene expression signatures in peripheral blood cell from Japanese women exposed to environmental cadmium / D. Satoru, K. Tomoko, U. Hirokazu, H. Mineyoshi, O. Etsuko, H. Hyogo, K. Fujio, A. Keiko, S. Satoshi, R. Kazuhito, A. Kokichi // *Toxicology*. – 2009. – V. 257, № 1-2. – P. 25-32.

203. Shuralev, E. Application of the Enfer chemiluminescent multiplex ELISA system for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in goats. / E. Shuralev, P. Quinn, M. Doyle, A. Duignan, H.F. Kwok, J. Bezos, S.A. Olwill, E. Gormley, A. Aranaz, M. Good, W.C. Davis, J. Clarke, C. Whelan // *Veterinary Microbiology*. – 2012. – V. 154, № 3-4. – P.292-297.

204. Simonet, M. Impaired resistance to *Listeria monocytogenes* in mice chronically exposed to cadmium / M. Simonet, P. Berche, J.L. Fauchere, M. Veron // *Journal of Immunology*. – 1984. – V. 53, № 1. – P. 155-163.

205. Stritsis, C. Cadmium dynamics in the rhizosphere and Cd uptake of different plant species Evaluated by a mechanistic model / C. Stritsis, B. Steingrobe, N. Classen // *International Journal of Phytoremediation*. – 2014. – V. 16. – P. 1104-1118.

206. Tukcan, A. Cadmium – a novel risk factor for cardiac hypertrophy and heart failure / A. Tukcan, B. Messner, Th. Prohaska, D. Bernhard // *European Surgery*. – 2011. – V. 43. – P. 24.

207. Whelan, C. Multiplex immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. / C. Whelan, E. Shuralev, G. O'Keeffe, P. Hyland, H.F. Kwok, P. Snoddy, A. O'Brien, M. Connolly, P. Quinn, M. Groll, T. Watterson, S. Call, K. Kenny, A. Duignan, M.J. Hamilton, B.M. Buddle, J.A. Johnston, W.C. Davis, S.A. Olwill, J. Clarke // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2008. – V. 15, № 12. – P.1834-1838.

208. Whitman, W. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 5: The Actinobacteria. / W. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. Trujillo, W. Ludwig, K.-I. Suzuki, A. Parte. – Springer-Verlag New York, 2012. – p.1750.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА**Рисунки:**

1. Таксономическое дерево некоторых микобактерий и родственных видов (Michael D. Iseman, 2000) (с. 23).
2. Схема клеточной стенки туберкулезной бактерии (Michael D. Iseman, 2000) (с. 25).
3. Прирост массы тела кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$, г (с. 46).
4. Содержание церулоплазмينا в сыворотке крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$, мг/л (с. 55).
5. Уровень относительного содержания иммунокомпетентных клеток в крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$ (с. 60).
6. Местная реакция кроликов на введение иммуногенного материала при гипериммунизации суспензией клеток *M.bovis* Bovinus-8 (с. 65).
7. Денситограмма электрофореза антигенного материала из экстракта клеток и вторичных метаболитов *M.bovis* Bovinus-8 в 12,5%-ном полиакриламидном геле, окрашивание азотнокислым серебром (с. 66).
8. Денситограмма иммуноблота антигенного материала из экстракта клеток и вторичных метаболитов *M.bovis* Bovinus-8 с гипериммунной кроличьей сывороткой крови против клеток *M.bovis* (с.67).
9. Иммуноблот с сывороткой крови кролика, инфицированного *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$, в динамике инфекционного процесса (с. 72).
10. Патоморфологические изменения печени кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации $CdCl_2$ (с. 76).

11. Патоморфологические изменения селезенки кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 (с. 78).

12. Гистоструктуры печени кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , окраска гематоксилином Гарриса и эозином водным, объектив $\times 20$ (с. 80).

13. Гистоструктуры почек кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , окраска гематоксилином Гарриса и эозином водным, объектив $\times 20$ (с. 82).

14. Гистоструктуры легких кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , окраска гематоксилином Гарриса и эозином водным, объектив $\times 20$ (с. 84).

15. Гистоструктуры лимфатических узлов кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , окраска гематоксилином Гарриса и эозином водным, объектив $\times 20$ (с. 86).

16. Сканирующая автоэмиссионная электронная микроскопия клеток *M.bovis*, выделенных из внутренних органов кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , напыление золота-палладия (с. 90).

17. Электрофорез клеток *M.bovis* Bovinus-8, выделенных из внутренних органов кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , окрашивание озотнокислым серебром (с. 91).

18. Уровень содержания Cd в мясе и продуктах убоя кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , мг/кг (с. 98).

Таблицы:

1. Схема опыта на модельных животных (с. 36).
2. Праймеры и зонды, использованные для идентификации *M.bovis* методом ПЦР (с. 41).
3. Компоненты реакционной смеси для постановки ПЦР (с. 41).

4. Показатели температуры тела, кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , °C ($M \pm m$) (с. 45).
5. Живая масса кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , кг ($M \pm m$) (с. 45).
6. Показатели содержания общего белка и белковых фракций в сыворотке крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , г/дл ($M \pm m$) (с. 49).
7. Показатели активности ферментов в сыворотке крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , nkat/л ($M \pm m$) (с. 53).
8. Лейкоцитарная формула крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 ($M \pm m$) (с. 58).
9. Уровень специфических туберкулезных антител в сыворотке крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , в ИФА, ОЕ (с. 71).
10. Абсолютная и относительная масса печени кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , г ($M \pm m$) (с. 77).
11. Абсолютная и относительная масса селезенки кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , г ($M \pm m$) (с. 77).
12. Фотометрия селезенки кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , мм ($M \pm m$) (с. 79).
13. Распространение микобактерий в организме кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 (с. 88).
14. Биохимические свойства микобактерий, выделенных из внутренних органов кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 (с. 89).

15. Соответствие возбудителя, выделенного из суспензий внутренних органов кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , нативной культуре (с. 92-93).

16. Остаточное содержание Cd в органах и тканях кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl_2 , мг/кг ($M \pm m$), мг/дл (с. 95).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Справка о внедрении результатов диссертационной работы

Приложение 2. Технологический регламент получения антигена из клеточной стенки *Micobacterium bovis* Bovinus-8.

Приложение 3. Способ получения гипериммунной сыворотки к микобактериальным антигенам. Методические рекомендации.

Приложение 1



Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ОГРН 1021602841391

ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ

Кремлевская ул., д.18, Казань, 420008
тел. (843) 2365018, (843) 2365062; факс (843) 2365018
email: ecology@kpfu.ru

16.03.2016 № 1.1.2.01.1.01-35/25

На № _____ от _____

В Диссертационный совет Д 220.003.02 при
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный
аграрный университет»

450001 г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34

СПРАВКА

о внедрении результатов диссертационной работы
Валеевой Анны Рафкатовны

«Влияние кадмия на функциональные показатели состояния здоровья животных при
экспериментальном туберкулезе», представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальностям

06.02.05 – Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарная экспертиза
(биологические науки) и 06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпи-
зоотология с микотоксикологией и иммунология (биологические науки)

Материалы диссертационной работы Валеевой А.Р. «Влияние кадмия на функциональные показатели состояния здоровья животных при экспериментальном туберкулезе» используются в учебном процессе Института экологии и природопользования ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» при чтении курсов: «Экологическая эпидемиология» для подготовки бакалавров по направлению подготовки 05.03.06 «Экология и природопользование»; и «Основы биологической безопасности» для подготовки магистров по направлению подготовки 05.04.06 «Экология и природопользование».

Директор



С.Ю.Селивановская

Приложение 2

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Департамент научно-технологической политики и образования
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ И
БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

УТВЕРЖДАЮ
Зам.директора по НИР и биологической
безопасности ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»,
д.б.н.
А.Н. Чернов
« 7 » *Июль* 2016 г.



**Технологический регламент
получения антигена из клеточной стенки M.bovis Bovinus 8**

Казань 2016

Научный руководитель:

зав. лаб. иммунологии, д.б.н.



М.А. Ефимова

Ответственный исполнитель в.н.с., к.б.н.



К.С. Хаертынов

Исполнители:

с.н.с.



Р.М. Ахмадеев

м.н.с



А.Р. Валеева

аспирант



Р.Р. Хоснетдинов

соискатель



А.В. Москвичева

Методические положения

Антиген получаемый из клеточных стенок предназначен для выявления больных туберкулезом животных, а также является одним из компонентов, который будет использоваться при создании тест-системы для дифференциальной диагностики туберкулеза методом иммуноблотинга и ИФА.

Технологический процесс получения антигена из клеточной стенки *M.bovis Bovinus 8*

1. Культивирование *M. bovis Bovinus-8* на среде Левенштейна-Йенсена в матровых колбах в течение 60 дней.
2. Отмывка культуры с твердой питательной среды Левенштейна-Йенсена 0,9 % раствором хлорида натрия (трехкратно), с последующим кипячением в течение 1 часа с целью инактивации культуры на водяной бане.
3. Бактериальную взвесь гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе не менее 15 минут.
4. Взвесь клеток микобактерий помещают в трис-НСl буфер рН 7,2-7,4 и встряхивают на магнитной мешалке в течение 7 дней.
5. Взвесь гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе 15 минут, затем центрифугируют при 13000 об/мин на центрифуге К-24D в течение 30 мин.
6. Супернатант используют, а осадок замораживают.
7. Супернатант осаждают последовательно в 25 %, 50%, 75%-ном растворе сульфата аммония.
8. Отбирают последний осадок, полученный при осаждении в 75%-ном растворе сульфата аммония и разводят его в фосфатно-солевом буфере или трис-НСl буфере рН 7,2-7,4 и добавляют к нему С₂Н₅ОН в соотношении 1:1. На 1-3 суток ставят на холод (-20⁰С), выделяют осадок (качество получаемого антигена контролируют путем разделения получаемых образцов в ПААГ).
9. Осадок растворяют в фосфатно-солевом буфере или трис-НСl буфере рН 7,2-7,4 и полученный препарат используют для препаративного электрофореза в 10% ПААГ.
10. Отбирают фракции с 9 по 13. Они содержат одинаковое количество антигена клеточной стенки *M. bovis Bovinus-8* с молекулярной массой от 14 до 28 кДа.

Оборудование:

1. Камера Mini-PROTEAN TetraCell для проведения электрофореза и иммуноблота;

2. Mini Trans Blot Cell – прибор для проведения электропереноса на нитроцеллюлозу;
3. Прибор GellDoc XR+ с использованием программы Image Lab software;
4. Источник питания Power 3a Universal Power Supply (500 V|2.5|500V);
5. Mini Prep Cell- прибор для препаративного электрофореза с системой Frac 100 с ультрафиолетовой детекцией, коллектором фракций и самописцем;
6. Центрифуга PC-6;
7. Центрифуга Mini-Spin;
8. Пипетки автоматические переменного объема: 0,5, 10, 20, 200, 1000 мкл;
9. Термостат;
10. Центрифуга K-24D;
11. Водяная баня;
12. Гомогенизатор ELMi Sky Line;
13. Стеклоанный гомогенизатор.

Реактивы:

1. 0,9 %-ный раствор хлорида натрия;
2. Среда Левенштейна-Йенсена или ФАСТ-3;
3. 96 % этиловый спирт;
4. Трис-HCl –буфер рН 7,2-7,4;
5. 0,01M фосфатно-солевой буфер, рН 7,2-7,4;
6. 25 %, 50%, 75%-ный раствор сульфата аммония.

Для разделения образцов проб культур микобактерий методом электрофореза используют камеру Mini-PROTEAN TetraCell.

**Реактивы, используемые для электрофоретического
разделения и окрашивания полипептидов микобактерий**

Акриламид – 30% водный раствор. При приготовлении раствора необходимо использовать маску, резиновые перчатки и очки, так как он обладает нейротоксичностью.

N,N' - метиленбисакриламид – 1% водный раствор. Требуется соблюдения тех же мер предосторожности. Растворы обоих мономеров хранятся в темноте при +4⁰С, не более 3 месяцев.

Буфер для разделяющего геля – готовится 1,5 M водный раствор Трис(гидроксиметил)аминометана, рН которого должен быть 8,7 (доводится конц. HCl).

Буфер для концентрирующего геля – готовится 0,5 M водный раствор Трис(гидроксиметил)аминометана, рН которого должен быть 6,8 (доводится конц. HCl).

Оба буфера пригодны для работы только при соответствующем рН их растворов.

10%-ный раствор (вес на объем) додецилсульфата натрия в дистиллированной воде. Хранят при комнатной температуре.

10%-ный раствор (вес на объем) персульфата аммония в дистиллированной воде – готовят каждый раз свежий раствор непосредственно перед применением.

Хранению не подлежит!

N,N,N',N'- тетраметилендиамин (ТЕМЭД) – выпускается промышленностью, хранится при +4°C.

Буфер для лизиса (солюбилизации) образцов (1X) (no Laemmli U.K. 1970):

Трис(гидроксиметил)аминометан – 62,5 мМ, рН 6,8 (доводится конц. HCl)

Додецилсульфат натрия – 2%

Глицерин – 10%

2-меркаптоэтанол – 5%

Бромфеноловый синий – 0,001%

В некоторых случаях удобнее приготовить концентрированный (2^{-x} или 3^{-x} кратный) раствор, что обусловлено характером лизируемого материала.

Электродный буфер (рН 8,3):

Трис(гидроксиметил)аминометан – 0,0103 М

Кислота аминокусная (глицин) - 0,181 М

Додецилсульфат натрия – 0,1%

Электродный буфер обычно используют 2 – 3 раза, при изменении рН приготавливают новый. Хранят его при +4°C. Буфер из анодной камеры повторно не используется.

Калибровочный белковый кит – если используется коммерческий набор, то приготовление белков – калибрантов проводят согласно инструкции к нему. Мы рекомендуем пользоваться наборами фирмы Pharmacia Biotech. В случае использования отдельных очищенных белков с известными молекулярными массами, их подготавливают также как и исследуемые пробы, добиваясь оптимальной их концентрации опытным путем.

Фиксирующий раствор 1:

Уксусная кислота: изопропанол: вода (1:4:5 по объему)

Фиксирующий раствор 2:

Уксусная кислота: метанол (8:2 по объему)

Окрашивающий раствор:

0,25% красителя Кумасси R-250 в смеси метанол: уксусная кислота: вода (5:1:5 по объему)

Отмывочный раствор:

Уксусная кислота:изопропанол : вода (1:1:9 по объему)

Формалин

Раствор азотнокислого серебра:

Готовятся отдельно два раствора – раствор «А», содержащий 2,857% гидроксида аммония (NH₄OH) и 0,257% гидроксида натрия (NaOH); раствор «Б» - 20% водный раствор азотнокислого серебра. После этого раствор «А» небольшими порциями прибавляют к раствору «Б» до его полного просветления. В зависимости от размеров геля раствор азотнокислого серебра может быть разведен водой до требуемого объема. Приготовленный таким образом раствор азотнокислого серебра не подлежит длительному хранению и должен быть сразу же использован.

Проявляющий раствор:

Готовится раствор, содержащий 0,005% лимонной кислоты и 0,12% формальдегида (используется формалин, принимая концентрацию формальдегида в нем за 40%).

Фиксирующий раствор

Готовят 15% водный раствор натрия серноватисто-кислого (тиосульфат натрия).

Примечание: объемы всех приготавливаемых реагентов зависят от целей и масштабов исследований, а также сроков хранения тех или иных растворов.

Приготовление полиакриламидных гелей.

Стандартная система гелей для диск-электрофореза включает концентрирующую и разделяющую системы (Ornstein, 1964; Davis, 1964) с добавлением ДСН, согласно модификации Леммли (Laemmli, 1970).

Таблица 1. Приготовление разделяющих гелей
(по Cold Spring Harbor Methods Manual.)

Растворы, мл	Количество различных растворов для приготовления 30 мл разделяющего гелевого раствора с концентрацией мономера акриламида:						
	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	17,5 %	20 %
30% акриламид	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
1% бис-акриламид	7,8	5,2	3,9	3,1	2,6	2,2	2
1,5 M трис-HCl, pH 8,7	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5

H ₂ O	9,3	8,8	8,2	6,5	4,5	2,4	0,1
------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Для приготовления градиентного разделяющего геля берут две концентрации однородного в соотношении 1:1 и заливают при помощи градиентного смесителя.

Таблица 2. Приготовление концентрирующего геля

Раствор	количество (мл)
30% акриламид	1
1% бис-акриламид	1
0,5 М трис-HCl, pH 6,8	2,5
H ₂ O	5,35

Таблица 3. Катализаторы и добавки

Компонент	На 10 мл разделяющего геля	На 5 мл концентрирующего геля
10% р-р ДСН	100 мкл	50 мкл
ТЕМЭД	3 мкл	25 мкл
10% р-р персульфата аммония	33 мкл	25 мкл

Подготовка проб

В качестве материала могут быть использованы как живые культуры, так и обработанные различными агентами (этанол, ацетон, диметилсульфоксид) микроорганизмы. Ввиду того, что данные соединения вызывают изменения в нативной молекуле белка, мы сочли целесообразным изучать электрофоретические свойства микобактерий без обработки их этими агентами.

Культуры микобактерий смывают 0,9% раствором хлорида натрия, трижды центрифугируют при 4000 g по 15 мин, каждый раз заменяя при этом надосадочную жидкость свежим 0,9% раствором хлорида натрия. Таким образом происходит удаление остатков питательной среды и продуктов метаболизма бактерий. После третьего центрифугирования осадок ресуспензируют 0,9% раствором хлорида натрия, устанавливают концентрацию бактерий по стандарту мутности и с учетом данных о средней массе одной микробной клетки, разливают суспензию на аликвоты с таким расчетом, чтобы в одной аликвоте содержалось около 3 мг микобактерий и вновь осаждают центрифугированием при 4 000 g в течении 10 минут,

надосадочную жидкость тщательно удаляют. Последнюю процедуру рекомендуется проводить в микропипетке типа “Eppendorf”. К полученному таким образом осадку добавляют буфер для лизиса образцов (1X) (по Laemmli U.K. 1970 (6)) в количестве 250-300 мкл, тщательно пипетируют автоматической пипеткой и помещают в водяную баню при 100 °С на 5 минут. При этом смесь должна просветлеть, что говорит о солюбилизации белков. Иногда образцы удобнее просто разбавить равным объемом 2X концентрата буфера для лизиса образцов или добавить половину объема 3X концентрата того же буфера. Если же используются инактивированные сухие бактериальные порошки, то их сразу отвешивают и подвергают лизису. Для лучшей солюбилизации сухих образцов их можно суспендировать в небольшом объеме дистиллированной воды.

Лизаты бактериальной массы выравнивают по содержанию белка, которые устанавливают спектрофотометрически. Концентрация белка в препарате должна составлять 5-10 мг/мл, количество белка на трек: 50-150 мкг. Выравнивание концентрации белка производят путем добавления к соответствующей пробе необходимого количества дистиллированной воды, либо в случае низкой концентрации белка увеличивают объем вносимой пробы.

При подготовке очищенных белков-калибрантов стремятся к тому, чтобы их суммарная масса составляла также около 3 мг на 300 мкл буфера для разделяемых образцов, смесь белков прогревают при 100 °С на водяной бане 5 минут.

В любом случае окончательно качество подготовки проб оценивается по пробному разделению.

Реактивы, используемые для переноса

Буфер для переноса (pH 7,8 – 8,4):

Трис(гидроксиметил)аминометан – 0,025 M

Кислота аминокусная (глицин) – 0,192 M

Метиловый спирт – 20% (объем на объем)

Дистиллированная вода – до необходимого объема.

Буфер для отмывания:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,0075 M

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0025 M

NaCl – 0,15 M

Твин-20 – 0,05% (объем на объем)

Дистиллированная вода – до необходимого объема

pH 7,2 (доводится конц. HCl)

Блокирующий буфер:

Буфер для отмывания, содержащий 2% бычьего сывороточного альбумина или 5% сухого обезжиренного молока. Можно также использовать блокирующие жидкости импортного производства.

Первые антитела:

Антитела, обладающие специфичностью к исследуемым антигенам. Разведение антител устанавливается исходя из их титра, предварительно установленного какой-либо серологической реакцией с исследуемым антигеном (микроорганизмом) в РА, ИФА и т.п. Мы рекомендуем использовать разведение антител с титром не более чем 1:600 – 1:800 в РА.

Вторые антитела (антиглобулины, конъюгат):

Антитела к Ig G того вида животного, от которого были получены первые антитела (кролик, мышь, свинья, крупный рогатый скот и т.д.), конъюгированные с каким-либо маркером

Наиболее часто используются антитела конъюгированные с пероксидазой хрена. Существуют коммерческие препараты конъюгированных с пероксидазой хрена антител к иммуноглобулинам различных видов животных. Разведение вторых антител определяют эмпирически, для коммерческих наборов – согласно инструкции.

Краситель для выявления белков-калибраторов на матрице:

краситель Понсо С

5% трихлоруксусная кислота

- растворить 0,3 г красителя в 100 мл 5% трихлоруксусной кислоты.

Раствор субстрата:

Широко используются следующие субстраты, дающие не растворимые окрашенные продукты, в данном случае:

3,3'-диаминобензидин (ДАБ) тетрагидрохлорид – красно-коричневый. Буфер для ДАБ - трис(гидроксиметил)аминометан 50 мМ рН 7,4 (доводится конц. HCl). В 10 мл буфера растворяют 0,5 мг субстрата. Непосредственно перед реакцией в оба субстрата добавляют H₂O₂ (5 мкл на 20 мл).

Примечание: субстраты ферментов обладают канцерогенными свойствами, при работе с ними необходимо соблюдать меры предосторожности.

Электрофоретический перенос полипептидов микобактерий разделенных методом диск-электрофореза в ПААГ-ДСН на твердофазный носитель с помощью прибора Mini Trans Blot Cell

Чтобы не загрязнить твердофазный носитель, все процедуры выполняют в резиновых перчатках.

1. Отделяют полиакриламидный гель от стекла в кювете с дистиллированной водой.
2. Переносят гель на толстую фильтровальную бумагу, пропитанную буфером для переноса, при этом необходимо срезать один из углов геля для того чтобы знать где находится начало разделения и последовательность проб.
3. Вырезать лист нитроцеллюлозы, соответствующий размерам геля, отметить на нем шариковой ручкой матовую сторону (сторона соприкосновения с гелем) и край соответствующий срезанному углу геля. Замочить лист нитроцеллюлозы в буфере для переноса на 10 – 15 мин.
4. Если в качестве электродов используются угольные пластины, то их также необходимо предварительно замочить в буфере для переноса. После этого на нижний (положительно заряженный) электрод укладывают 10 листов фильтровальной бумаги Whatman, пропитанных буфером для переноса, следя за тем, чтобы между листами не оставались пузырьки воздуха, затем лист диализной пленки, два листа фильтровальной бумаги, также смоченные буфером для переноса. Поверх всего этого размещают предварительно подготовленный лист нитроцеллюлозы (матовой стороной вверх!), тщательно разравнивают не оставляя пузырьков воздуха и после этого укладывают полиакриламидный гель, также тщательно разравнивая и не оставляя пузырьков воздуха. На гель помещают еще 10 листов фильтровальной бумаги Whatman, все разравнивают, сверху накладывают второй электрод (отрицательно заряженный и подают электрический ток).
5. После блоттинга конструкцию разбирают, полиакриламидный гель окрашивают одним из общепринятых способов (для оценки полноты переноса), от нитроцеллюлозной мембраны отрезают участок (полоску) контактировавший с участком геля в котором находились белки-калибранты и окрашивают в течение 5 минут красителем для выявления белков-калибрантов (см. реагенты, используемые для переноса), промывают водой и высушивают.

Оставшуюся нитроцеллюлозу подвергают следующей обработке:

- I. отмыть 3 раза в буфере для отмывания, по 10 мин
- II. поместить в блокирующий буфер (100 мл, 30 мин) при +37⁰C
- III. отмыть 2 раза в буфере для отмывания, по 10 мин
- IV. поместить в соответствующее разведение специфической сыворотки (сыворотка кроликов, гипериммунизированных инактивированными сальмонеллами) на физ. растворе (50 мл) на 6 ч при +4⁰C или на 30 мин при +37⁰C
- V. отмыть 3 раза в буфере для отмывания, по 10 мин

- VI. поместить в раствор конъюгата на 1 час при $+37^{\circ}\text{C}$ (1 флакон иммунопероксидазного конъюгата против Ig G кролика, на 20 мл блокирующего буфера) для нитроцеллюлозной мембраны размером $11 \times 7,5$ см.
- VII. отмыть 3 раза в буфере для отмывания, по 10 мин
- VIII. поместить в раствор субстрата (ДАБ 60 мг + 100 мл 50 мМ трис-НСl рН 7,3 + 25 мкл H_2O_2) на 15 – 20 мин до четкого проявления полос (в темноте).
- IX. Тщательно промыть дистиллированной водой, высушить.

Примечание: для исключения неспецифических реакций необходимо в каждый опыт включать «контрольную полосу», которую подвергают обработке конъюгатом, минуя стадию с первыми (специфическими) антителами. При правильно подобранных условиях никаких окрашенных полос на ней выявляться не должно.

Производственные отходы при изготовлении антигена и методы их уничтожения

Бактериальную культуру используемую для получения антигена, предварительно инактивируют методом кипячения или автоклавирования в течении 2 часов при 1,5 атм в течение 2 часов с соблюдением всех требований и безопасности при работе с особо опасными инфекциями 3 группы патогенности в соответствии с требованиями Санпин.

Приложение 3

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ДЕПАРТАМЕНТ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПОЛИТИКИ И
ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБНУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ,
РАДИАЦИОННОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»

УТВЕРЖДАЮ:

директор ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»



А.И.Никитин

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГИПЕРИММУННОЙ СЫВОРОТКИ К
МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫМ АНТИГЕНАМ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Казань, 2016

Способ получения гипериммунной сыворотки к микобактериальным антигенам: методические рекомендации.

Методические рекомендации разработали: м.н.с. А.Р. Валеева, в.н.с., к.б.н. К.С. Хаертынов, с.н.с., к.в.н. Р.М. Ахмадеев, в.н.с., к.в.н. Э.А. Шуралев

Методические рекомендации предназначены для использования в учебных и научно-исследовательских организациях биологического и ветеринарного профиля, а также в практической деятельности межрегиональных, областных, республиканских и районных ветеринарных лабораторий.

Методические рекомендации рассмотрены и одобрены научно-методическим советом ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»:
протокол № 4 от « 29 » декабря 2016 г.

Рецензенты:

В.н.с. лаборатории биохимии и молекулярно-генетического анализа ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», к.в.н. К.В. Усольцев

С.н.с. лаборатории биохимии и молекулярно-генетического анализа ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», к.б.н. Л.И. Зайнуллин

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез остается важной социально-экономической проблемой и представляет угрозу агропромышленному комплексу страны (Овдиенко Н.П. и соав., 2009). По данным Всемирной организации здравоохранения, среднегодовая смертность, обусловленная туберкулезом в мире, составляет около 3 млн. случаев. Напряженность эпидемиологической и эпизоотической ситуации связана с изменчивостью патогенных свойств возбудителя, с повышением лекарственной устойчивости микобактерий; их способностью передаваться через животных других видов, являющихся носителями возбудителя туберкулеза и другими факторами. В Российской Федерации ситуация по туберкулезу в сельскохозяйственном секторе относительно стабильна, однако последнее время стали возникать новые эпизоотические очаги. Для оздоровления неблагополучных территорий от туберкулеза важнейшее значение имеет точная и своевременная лабораторная диагностика. Существующие методы диагностики туберкулеза имеют определенные недостатки (Агеева Т.Н., Лысенко А.П., Красникова Е.М., 2005; Верховский О.А., Найманов А.Х., Савицкая О.А., 2006). Так, прижизненная диагностика туберкулеза крупного рогатого скота на основе аллергической внутрикожной туберкулиновой пробы дает ложноположительные результаты, бактериологический метод – длительный и недостаточно чувствительный. Биопроба на лабораторных животных – длительна (до 2-3-х месяцев) и трудоемка. Высокой чувствительностью и специфичностью обладают иммунологические методы диагностики туберкулеза разных видов животных и человека, в том числе иммуноферментный анализ (ИФА) и иммуноблот (Якупов Т.Р., Хаертдинов К.С., 2011; Шуралев Э.А., Ндаишшимие Э.В., Мукминов М.Н., 2012; Альфредо Э. и соав., 2013). Большинство из них осуществляется с применением сывороток крови, иммунизированных различными антигенами (АГ) животных. При этом активность иммунных сывороток оказывает существенное влияние на результат серологических реакций. Для получения высокоактивных и специфичных сывороток применяют несколько схем иммунизации. Уровень специфических антител (АТ) зависит от множества факторов: качества и количества вводимого АГ, способа и кратности введения, применения вспомогательных веществ (Алиева Е.В. и соав., 2008; Хисматуллина Н.А. и соав., 2014). Подбор адекватной схемы иммунизации позволяет в короткие сроки получить сыворотки с высоким титром АТ. Описанный в данных методических рекомендациях способ основан на методе Bailey G.S., 1984.

Данные методические рекомендации предназначены для получения высокоактивных гипериммунных сывороток крови животных к микобактериальным АГ.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1.1. Используемое оборудование

Для подготовки антигенного материала:

- гомогенизатор FastPrep-24 (MP Biomedicals);
- стандартный отраслевой образец мутности бактериальных взвесей, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
- центрифуга.

Для отделения и хранения сыворотки крови:

- холодильник, поддерживающий температуру +2-8°C;
- морозильная камера, поддерживающая -30°C;
- термостат суховоздушный.

1.2. Используемые реактивы и расходные материалы:

- вакуумные пробирки с активатором свертывания;
- козы антителя против иммуноглобулинов кролика, меченные пероксидазой;
- неполный адьювант Фрейнда;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10, 200 и 1000 мкл;
- питательная среда Левенштейна-Йенсена;
- пробирки для гомогенизатора (Lysing Matrix B, MP Biomedicals);
- стерильный физиологический раствор;
- штаммы рода *Micobacterium*;
- шприц инсулин-туберкулиновый стерильный одноразовый объемом 1 см³.

2. ПРИНЦИПЫ ПОЛУЧЕНИЯ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК

Принцип получения гипериммунных сывороток основан на способности АГ индуцировать образование АТ и специфичности иммунного ответа. При введении в организм чужеродных макромолекулярных веществ образуются АТ и эффекторы клеточного иммунитета. Иммунный ответ на каждый индивидуальный антиген специфичен. При этом прослеживается зависимость антителогенеза от дозы вводимого АГ, кратности и способа введения.

3. ПОДГОТОВКА АНТИГЕННОГО МАТЕРИАЛА

Антигенный материал получают из шестинедельной культуры штамма *M.bovis* Bovinus-8, выращенной на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена, приготовленной по классическому рецепту. Клетки микобактерий снимают с поверхности питательной среды с помощью микробиологической петли и пятикратно отмывают стерильным физиологическим раствором (ФР, ГОСТ 10444.1).

После последней промывки осадок разводят в 1 мл ФР, весь объем переносят в специальные пробирки Lysing Matrix В. Далее суспензию гомогенизируют на приборе Fast Prep-24 в режиме 2×45s. Разрушенные таким образом клетки используют для иммунизации. Инактивацию микобактерий контролируют посевами на селективные питательные среды.

4. ПОДГОТОВКА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Выбор кроликов для иммунизации обусловлен удобством содержания в лабораторных условиях, качеством и количеством получаемых иммунных сывороток крови. В период проведения иммунизации условия кормления и содержания всех животных должны быть одинаковыми и соответствовать существующим зоотехническим нормам (ГОСТ 33216-2014).

5. ПОРЯДОК ПОЛУЧЕНИЯ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК

Получение гипериммунных сывороток включает ряд последовательных этапов: подготовка антигенного материала, иммунизация животных, забор крови и отделение сыворотки.

- 5.1. Суспензию разрушенных клеток микобактерий смешивают с неполным адьювантом Фрейнда (Inject[®] Freund's Incomplete Adjuvant, Thermo Scientific) из расчета: 0,5 мл концентрированной суспензии клеток микобактерий, содержащей 10 ЕД микробных тел/мл (по стандартному отраслевому образцу мутности бактериальных взвесей, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России), 1 мл стерильного ФР и 1,5 мл адьюванта.
- 5.2. Кроликов массой 2,5-3 кг иммунизируют внутривенно многоточечно вдоль спины (по 5 точек с каждой стороны). В каждую точку вводили по 0,1 мл подготовленного антигенного материала.
- 5.3. Через 8 недель после первого цикла проводят повторную иммунизацию. В нижнюю треть шеи с обеих сторон подкожно вводят по 0,5 мл подготовленного тем же способом антигенного материала (п.4.1.).
- 5.4. Антителогенез контролируют, осуществляя забор крови на определенные сроки от первой иммунизации – через каждые 7 сут. в течение 9 недель. Образование АТ в сыворотке крови определяют методом непрямого ИФА и иммуноблота с применением исходного антигенного материала и специфичного антивидового конъюгата.
- 5.5. На 55-60 сут. от первой иммунизации осуществляют тотальный забор крови с последующим отделением сыворотки крови.
- 5.6. Качество гипериммунных сывороток контролируют, определяя титры антител в реакциях ИФА и иммуноблот.
- 5.7. Полученную сыворотку замораживают и хранят при температуре -30°С.

6. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

При работе с антигенным материалом и лабораторными животными необходимо соблюдать ряд требований СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Литература

1. Агеева, Т.Н. Корреляционная зависимость выявления в крови иммунных комплексов и микобактериальных антигенов с помощью ИФА и результатов бактериологической диагностики туберкулеза на среде ВКГ / Т.Н. Агеева, А.П. Лысенко, Е.М. Красникова // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2005. – №2. – С. 39-42.
2. Алиева, Е.В. Опыт получения иммунных сывороток для производства диагностических препаратов / Е.В. Алиева, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев и др. // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2008. – № 1 – С. 10-13.
3. Альфредо, Э. Способ получения антигена с молекулярной массой 45 кДа из *Mycobacterium tuberculosis* / Э. Альфредо, В.И. Вершинина, К.С. Хаертынов и др. // Журнал фундаментальные исследования. – 2013. – №1. – С. 18-22.
4. Верховский, О.А. Диагностическое значение реакций клеточного иммунитета при туберкулезе крупного рогатого скота / О.А. Верховский, А.Х. Найманов, О.А. Савицкая // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных, Всерос. науч.-исслед. ин-т эксперим. ветеринарии. – Москва, 2006. – С. 180-184.
5. Овдиенко, Н.П. Туберкулез как международная и национальная медико-ветеринарная проблема в современных условиях / Н.П. Овдиенко, А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко и др. // Ветеринарный врач. – 2009. – № 2. – С. 14-17.
6. Шуралев, Э.А. К вопросу серологической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / Э.А. Шуралев, Э.В. Ндайишимийе, М.Н. Мукминов // Ученые записки КГАВМ им.Н.Э.Баумана. – 2012. – Т.211. – С. 202-206.
7. Хисматуллина, Н.А. Сравнительная оценка эффективности схем иммунизации кроликов для получения диагностических сывороток при туберкулезе / Н.А.Хисматуллина и др. // Биотехнология: реальность и перспективы: мат. Междунар. науч.-практ. конф. – Саратов, 2014.– С. 218-219.
8. Якупов, Т.Р. Иммуноблот анализ в диагностике туберкулеза / Т.Р. Якупов, К.С. Хаертдинов // Ветеринарный врач. – 2011. – №1. – С. 29-31.
9. Bailey, G.S. The production of antisera / G.S. Bailey // Meth. Mol. Biol. – 1984. – V. 1 – P. 295-300.