

На правах рукописи

Сошникова Екатерина Михайловна

**ДИНАМИКА БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В
СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ ТУБЕРКУЛЕЗОМ И
ПАРАТУБЕРКУЛЕЗОМ**

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

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва-2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р.Коваленко» (ФГБНУ ВИЭВ).

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, Лауреат Премии Правительства РФ, с.н.с.
Устинова Галина Ивановна

Официальные оппоненты:

Букова Наталия Константиновна, доктор биологических наук, профессор
ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов», ученый секретарь
Мясоедов Юрий Михайлович, кандидат биологических наук,
ФКП «Курская биофабрика», начальник ОБТК

Ведущая организация: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллёза и туберкулёза животных».

Защита диссертации состоится «___» _____ 2016 года в «___» часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02 при ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р.Коваленко» по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д.24, к.1, тел.(495) 970-03-67.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВИЭВ.
Диссертация опубликована на официальном сайте ФГБНУ ВИЭВ—
<http://www.viev.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2016 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

И.Ю.Ездакова

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Туберкулез крупного и мелкого рогатого скота представляет собой одну из актуальнейших проблем инфекционной патологии сельскохозяйственных животных. Это заболевание наносит не только экономический ущерб сельскому хозяйству, но и по-прежнему остается социально-биологической проблемой, постоянно требующей проведения не только противотуберкулезных мероприятий, но и углубления теоретических знаний о сущности ответной реакции макроорганизма на возбудителя туберкулеза. Известно, что ведущая роль в развитии туберкулезного процесса принадлежит реактивности, поэтому считается более перспективным познание биохимического состояния крови животного для определения реактивности и естественной резистентности к инфекциям. Однако до сих пор отсутствуют биохимические тесты, с помощью которых можно было бы прогнозировать тенденцию развития туберкулезного процесса.

В последнее время широко развивается козоводство. Коз разводят чаще в фермерских и индивидуальных хозяйствах, где они содержатся с крупным рогатым скотом и птицей, которые могут быть больными туберкулезом и являются источником возбудителя болезни для этих видов животных. Поэтому важен контроль благополучия коз по туберкулезу.

Существует противоречивое суждение о восприимчивости коз к различным видам возбудителя туберкулеза. Длительное время существовало мнение о невосприимчивости или малой восприимчивости коз к возбудителю туберкулеза. F.Tragati et al. (1977) считает, что козы резистентны к *M.tuberculosis*, а более восприимчивы к *M.bovis*. Thorel et al. (1990) указывают, что козы более восприимчивы к бычьему виду, несколько менее – к птичьему, и сравнительно устойчивы к человеческому виду туберкулезных микобактерий (А.Х. Найманов и соавт., 2003, 2014).

Для изучения восприимчивости коз к возбудителю *M.bovis* был поставлен в эксперименте опыт при алиментарном заражении.

Возбудителем паратуберкулеза является *Mycobacterium avium*, subspecies *paratuberculosis*, который вызывает заболевание у крупного рогатого скота, овец, коз, верблюдов, северных оленей и других домашних и диких животных с характерным поражением желудочно-кишечного тракта. Паратуберкулез домашних животных распространен во многих странах мира, о чем свидетельствуют многочисленные данные зарубежной литературы. По данным МЭБ паратуберкулез зарегистрирован в 61 стране мира, в том числе и в нашей стране (Шуляк Б.Ф., 2005).

Паратуберкулез — инфекционная болезнь, которая характеризуется эпизоотологическими, патогенетическими и другими особенностями, изучению поддается с большим трудом. По мнению Щуревского В.Е. и Овдиенко Н.П. (1985), а также Насынова Б.Б. (1995) до настоящего времени недостаточно определены причины и условия, при которых лишь у некоторых инфицированных животных возникает интенсивное размножение возбудителя и развивается своеобразная патология в кишечнике, нарушая его основные физиологические функции, что приводит к полному истощению и летальному исходу.

В связи с указанным, для детального изучения патогенеза данного заболевания нами поставлен эксперимент по воспроизведению паратуберкулезной инфекции на мелком рогатом скоте, с целью проследить за динамикой развития процесса болезни.

Цель и задачи

Целью настоящей работы было изучение динамики количественных параметров биохимических показателей в сыворотке крови при экспериментальном заражении *Mycobacterium bovis* коз и *Mycobacterium avium*, subspecies *paratuberculosis* коз и овец в зависимости от стадии

развития инфекционного процесса, с учетом аллергической и иммунологической реактивности зараженных животных.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

– изучить аллергическую реактивность подопытных экспериментально зараженных животных в динамике инфекционного процесса туберкулеза и паратуберкулеза;

– изучить динамику биохимических показателей сыворотки крови при туберкулезе коз и паратуберкулезе коз и овец;

– дать сравнительную оценку изменения биохимического состава сыворотки крови мелкого рогатого скота при алиментарном и внутривенном заражении паратуберкулезом;

- дать сравнительную оценку изменения биохимического состава сыворотки крови коз при туберкулезе и паратуберкулезе.

Научная новизна:

Представлена характеристика биохимического состава крови в динамике инфекционного процесса туберкулеза при экспериментальном заражении коз.

Определены количественные изменения в основных биохимических показателях крови мелкого рогатого скота (козы, овцы) при различных способах заражения возбудителем паратуберкулеза в экспериментальных условиях.

Установлено, что степень изменений биохимических показателей крови мелкого рогатого скота зависит от метода заражения.

Установлено, что изменения биохимического состава в крови у мелкого рогатого скота может служить дополнительным диагностическим тестом при дифференциации туберкулеза и паратуберкулеза.

Практическая значимость:

- Результаты исследований включены в «Методические рекомендации по диагностике микобактериальных инфекций», утвержденные отделением ветеринарной медицины РАСХН, 2012 г.

- Биохимическое исследование сыворотки крови позволяет оценить степень органного поражения организма возбудителем болезни на разных стадиях ее течения.

- Изменение биохимического состава в сыворотке крови происходит на ранних стадиях заболевания, поэтому регулярное и систематическое биохимическое исследование сыворотки крови в неблагополучных хозяйствах может служить одним из дополнительных методов диагностирования инфекций на ранних стадиях развития инфекционного процесса.

- Учитывая особенности изменений биохимических показателей сыворотки крови при туберкулезе и паратуберкулезе в динамике развития патологического процесса, их сходства и различия, исследование биохимического состава крови можно использовать в качестве дополнительного теста при установлении диагноза и при дифференциации микобактериозов.

Апробация работы: Основные положения диссертационной работы доложены на Международной научно-практической конференции «Достижения супармолекулярной химии и биохимии в ветеринарии и зоотехнии», посвященной 80-летию кафедры биохимии ФГОУ ВПО МГАВМиБ (2008), Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию МГАВМиБ (2009). Основные положения, выводы и практические предложения, изложенные в диссертации, обсуждены на межлабораторном совещании научных сотрудников ВИЭВ.

Публикации результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, в т. ч. 4 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации.

Личный вклад соискателя заключается в проведении биохимических исследований сыворотки крови от опытных и контрольных животных по следующим показателям: общий белок, мочевины, креатинин, общий кальций, неорганический фосфор, общее железо, билирубин (общий и прямой), АсТ, АлТ, щелочная фосфатаза, общий холестерин, триглицериды; анализе, обобщении и интерпретации полученных результатов собственных исследований; в подготовке научных публикаций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 138 страницах, и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, их обсуждения, выводов и списка литературы в количестве 335 источников, из них 217 отечественных и 118 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 7 таблицами и 32 рисунками.

Основные положения, выносимые на защиту:

- данные, полученные при экспериментальном заражении коз *Mycobacterium bovis*; динамика биохимических показателей крови коз и их интерпретация;
- результаты, полученные при экспериментальном заражении овец и коз *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*; динамика биохимических показателей в сыворотке крови овец, коз и их интерпретация;
- сравнительная оценка различных методов экспериментального заражения живой культурой паратуберкулеза мелкого рогатого скота;
- сравнительная оценка изменения биохимического состава крови мелкого рогатого скота при туберкулезе и паратуберкулезе.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

Работа проведена в 2006 - 2015 годах в два этапа в соответствии с Российской НТП фундаментальных и приоритетных прикладных исследований по научному обеспечению развития АПК, заданию 02.01.01 на базе лаборатории биохимии имени Г.Ф.Коромылова, лабораториях

микобактериозов и патоморфологии, а также на опытной базе ФГНУ «Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р.Коваленко» (г. Вышний Волочек, Тверской области).

В работе было задействовано 20 коз и 11 овец 3-4 месячного возраста.

Биохимические исследования сыворотки крови проводили в лаборатории биохимии ВИЭВ. Для оценки динамики биохимических процессов в организме у экспериментально зараженных туберкулезом коз были выбраны следующие показатели сыворотки крови: глюкоза, мочевины, креатинин, щелочная фосфатаза, общий белок, общий кальций, неорганический фосфор, аспартатаминотрансфераза (АсТ), аланинаминотрансфераза (АлТ), билирубин (общий и прямой), холестерин, триглицериды и железо.

Общий белок определяли рефрактометрически, остальные вышеперечисленные показатели определяли электро-фотокolorиметрически по методикам, прилагаемым к соответствующим аналитическим наборам реактивов для ФЭК чешской фирмы «Лахема Эрба Рус».

Полученный материал обработан статистически с помощью программы БИОСТАТ для Windows.

Постановка эксперимента

ТУБЕРКУЛЕЗ

В эксперименте использовали 9 коз в возрасте до одного года. Перед началом опыта всех коз исследовали симультанной пробой с ППД туберкулином для млекопитающих и КАМ. При учете результатов симультанной пробы были получены отрицательные результаты исследований. Сформировали 2 группы животных: в опытной группе 6 коз, в контрольной – 3. Животные первой группы были заражены алиментарно взвесью патологического материала от павших морских свинок с генерализованной формой туберкулеза, с характерными для туберкулеза изменениями, козы 2-ой группы – контрольные, содержались изолированно

от зараженных. Повторное заражение провели через 14 дней взвесью культуры *M.bovis* в дозе 1 мг бактериальной массы на кг массы животного. Животных содержали в боксах 6 месяцев.

Таблица 1

Схема постановки эксперимента

№ группы	Предназначение группы	Количество коз	Способ и метод заражения	
			АЛИМЕНТАРНЫЙ	
1	Опытная	6 голов	1-е заражение взвесью патматериала от павших морских свинок с генерализованной формой туберкулеза	2-е заражение проведено через 14 суток взвесью культуры <i>M.bovis</i> в дозе 1 мг бактериальной массы на кг массы животного
2	Контрольная	3 головы	Содержались изолировано от зараженных животных	

Первое аллергическое исследование экспериментально зараженных и контрольных коз провели через 21 сутки после последнего заражения. Последующие аллергические исследования проводили через каждые 30-60 суток пальцебральной туберкулиновой пробой с использованием ППД туберкулина для млекопитающих. В эти же сроки брали пробы крови для биохимических исследований.

ПАРАТУБЕРКУЛЕЗ

По принципу аналогов были подобраны по 11 козлят и ягнят 3-4 месячного возраста, из которых сформировали 3 группы (по 2 опытных и по 1 контрольной).

Перед началом опыта провели клинический осмотр с термометрией всех животных, взяли кровь для проведения серологических и биохимических исследований, провели туберкулинизацию животных ППД туберкулином для млекопитающих пальцебрально в правое нижнее веко, и ППД туберкулином для птиц в левое нижнее веко в дозе 5000 ЕД в 0,2 мл.

После учета аллергических реакций через 24 и 48 часов, убедившись, что все животные реагировали отрицательно на оба туберкулина, проводили заражение животных опытных групп по следующей схеме.

Козлятам 1-ой опытной группы (5 гол.), заражение проводили per os суспензией *Mycobacterium avium, subspecies paratuberculosis* в дозе 0,15 мг бактериальной массы в 150 мл физиологического раствора. Козлят 2-ой опытной группы (3 гол.) заражали внутривенно однократно суспензией микобактериальных клеток в дозе 8 мг в 2 мл физиологического раствора, 3-я группа – контрольная (3 гол.). Им вводили физраствор в аналогичной дозировке. Ягнят подбирали, формировали в группы (опытные - в 4-ой – 5 гол., в 5-ой – 3 гол.; контрольные – в 6-ой – 3 гол.) и заражали аналогично вышеописанной схеме у козлят. Заражение опытных козлят (1-я группа) и ягнят (4-я группа) повторили трехкратно с интервалом 14 суток. Контрольных животных содержали изолировано от опытных. Перед каждым заражением проводили клинический осмотр с термометрией, туберкулинизацию животных с последующим учетом реакции через 24 и 48 часов, а также производили забор крови для проведения серологических и биохимических исследований.

Эксперимент по воспроизведению паратуберкулеза проводили в течение 11 месяцев, после чего все животные были вынужденно убиты.

Таблица 2

Схема проведения эксперимента

№ группы	Предназначение	Кол-во голов	Способ заражения	Кратность
Козлята				
1	Опытная	5 голов	Алиментарно суспензией <i>Mycobacterium avium, subspecies paratuberculosis</i> в дозе 0,15 мг бактериальной массы в 150 мл физиологического раствора.	3-кратно с интервалом 2 недели
2	Опытная	3 головы	Внутривенно суспензией	Однократно

			микобактериальных клеток в дозе 8 мг в 2 мл физиологического раствора	
3	Контрольная	3 головы	Незараженные, содержащиеся изолировано	
Ягнята				
4	Опытная	5 голов	Алиментарно суспензией <i>Mycobacterium avium</i> , <i>subspecies paratuberculosis</i> в дозе 0,15 мг бактериальной массы в 150 мл физиологического раствора.	3-кратно с интервалом 2 недели
5	Опытная	3 головы	Внутривенно суспензией микобактериальных клеток в дозе 8 мг в 2 мл физиологического раствора	Однократно
6	Контрольная	3 головы	Незараженные, содержались изолировано	

Результаты исследований

ТУБЕРКУЛЕЗ

Через 21 день после последнего заражения *M.bovis* все опытные козы реагировали на пальпебральную пробу с различной интенсивностью проявления аллергических реакций в месте введения туберкулина в области нижнего века. Козы контрольной группы не реагировали на аналогичное введение туберкулина.

Забор крови проводили пятикратно с интервалом 30 суток (в таблице 3 представлены результаты биохимических исследований перед заражением и убоем).

Анализируя полученные данные, установили значительное повышение некоторых показателей сыворотки крови уже на 30 сутки после заражения по сравнению с таковыми перед заражением (таблица 3).

Так, содержание общего белка в сыворотке крови зараженных коз увеличилось на 27%, а еще через 2 недели - на 34% и составило 81,7 г/л., затем его концентрация снизилась и составила 56 г/л. Концентрация других

Таблица 3.

**Изменение биохимических показателей сыворотки крови коз при
экспериментальном заражении *M.bovis***

(n = 9; M ± m; p ≤ 0,05)

№	Показатель	Ед. изм.	Перед заражением		60 сутки (перед убоем)	
			Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
1	Глюкоза	mmol/l	3,2 ± 0,1	3,4 ± 0,12*	3,4 ± 0,2	4,1 ± 0,14*
2	Мочевина	Umol/l	8,5 ± 0,3	8,5 ± 0,25	8,4 ± 0,4	12,55 ± 1,06*
3	Креатинин	Umol/l	71,23 ± 2,95	71,07 ± 0,94	78,5 ± 2,1	166,5 ± 14,9*
4	Щел. фосфатаза	мккат/л	7,3 ± 0,2	7,2 ± 0,2	9,23 ± 0,35	25,8 ± 3,1*
5	Общий белок	g/l	60,7 ± 2,43	60,9 ± 1,08	64 ± 0,5	56 ± 3,7*
6	АсТ	IU/L	22,87 ± 2,34	24,2 ± 0,4	25 ± 1,7	51,7 ± 2,97*
7	АлТ	IU/L	23,07 ± 0,4	22,97 ± 0,35	24,23 ± 2,17	52 ± 0,01*
8	Билирубин общий	Umol/l	9,07 ± 0,12	9,13 ± 0,23	9 ± 0,4	12,9 ± 1,3*
9	Билирубин прям.	Umol/l	0	0	0,07 ± 0,12	0,85 ± 0,21*
10	Холестерин	mmol/l	2,83 ± 0,12	2,77 ± 0,12	2,6 ± 0,2	4,2 ± 0,14*
11	Триглицериды	mmol/l	0,45	0,45	0,5 ± 0,06	1,8 ± 0,3*
12	Кальций	mmol/l	2,23 ± 0,06	2,23 ± 0,06	2,4 ± 0,2	1,4 ± 0,14*
13	Фосфор	mmol/l	1,83 ± 0,06	1,83 ± 0,06	1,8 ± 0,01	1,95 ± 0,07*
14	Железо	mmol/l	20,67 ± 1,16	20,67 ± 1,16	21,67 ± 1,53	15 ± 1,41*

азотистых соединений в сыворотке крови зараженных животных, таких как мочевина и креатинин, возрастала на протяжении всего опыта и к концу опыта их уровень возрос на 48%, и 134% соответственно.

На протяжении всего опыта наблюдается стойкая тенденция к снижению количества кальция и железа, увеличение содержания фосфора в сыворотке крови животных относительно контрольных групп. Так содержание кальция снизилось на 37%, железа - на 27,5% по отношению к уровню их перед заражением. Концентрация фосфора возросла на 8,7%.

Концентрация общего билирубина в сыворотке крови зараженных коз к концу опыта увеличилась на 43%.

Полученные данные свидетельствуют и о повышении ферментативной активности на протяжении всего опыта. К концу эксперимента активность АсТ увеличилась на 114% и составила 51,7 Е/л; АлТ- на 126%, что соответствует 52 Е/л. Активность щелочной фосфатазы также возростала на протяжении всего опыта с 7,2 Е/л до 25,8 Е/л, что 2,5 раза выше уровня перед заражением.

Также на протяжении всего опыта наблюдалась стойкая тенденция к увеличению концентрации глюкозы, общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови опытных животных. Так, содержание глюкозы увеличилось на 35 %, холестерина - на 55% и триглицеридов в 3 раза превысило стартовое значение.

Первоначально повышается содержание общего белка, мочевины и креатинина, что связано с нарушением порозности клеточных мембран и выходом в кровеносное русло белка, выделение которого с мочой вызывает нарушение фильтрации в почках и накопление мочевины и креатинина в сыворотке крови животных, что приводит к интоксикации организма. Нарушение всасываемости в кишечнике приводит к изменению в минеральном обмене: снижение уровня общего кальция в сыворотке крови объясняется вымыванием кальция из организма, что ведет к кальцинированию почечных лоханок. Все это в совокупности приводит к развитию воспалительного процесса, что сопровождается повышением концентрации щелочной фосфатазы. Также с развитием воспалительного процесса увеличивается вязкость крови, что сопровождается увеличением содержания глюкозы в сыворотке крови больных животных.

Повышение активности ферментов АсТ и АлТ, а также общего билирубина также указывает на воспалительный процесс в печени и желчевыводящих путях, приводящий к развитию гепаторенального синдрома. Увеличение концентрации холестерина и триглицеридов в

сыворотке крови опытной группы животных указывает на нарушения в липидном обмене.

Совокупность всех этих нарушений гомеостаза крови зараженных животных сопровождается клиническими проявлениями болезни: увеличением лимфоузлов, пневмонией, диспепсией.

При патологоанатомическом осмотре зараженных *M.bovis* коз были обнаружены характерные для туберкулеза изменения: казеозная пневмония, множественные гранулемы в печени, селезенке, тяжелое тотальное поражение лимфатических узлов с образованием лучистого казеоза и туберкулов. При гистологическом исследовании патматериала, у всех зараженных животных выявлены характерные для туберкулеза патоморфологические изменения.

ПАРАТУБЕРКУЛЕЗ

При пероральном заражении у опытных козлят и ягнят положительная реакция на туберкулины выявлена на 20 сутки после последнего заражения, у внутривенно зараженных животных положительная реакция (++++) наблюдалась на 62 сутки после заражения. Реакция на пальпебральную пробу проявлялась в виде припухлости (отека) нижнего века в месте введения туберкулинов. Козлята и ягнята, зараженные алиментарным путем, реагировали слабее на оба туберкулина и в дальнейшем эта реакция не проявилась. До конца опыта у всех животных контрольных групп реакция на туберкулины была отрицательной.

По результатам биохимических исследований наиболее выраженные изменения наблюдали в сыворотке крови у коз и овец, зараженных внутривенно (2-я и 5-я группы) (таблицы 4 и 5 – результаты биохимических исследований представлены перед заражением, перед падежом и убоем).

Уже на 60 сутки после заражения отмечено повышение концентрации общего белка в сыворотке крови на 28%, а к 180 суткам его значение составляло у коз 71 % и у овец составляло 109 г%, относительно стартовых

показателей перед заражением (63,9 г%). Так на 60 сутки содержание мочевины в сыворотке крови коз и овец увеличилось на 34% и составило 10,3 ммоль/л, креатинина – на 85 %, что соответствует 141 мкмоль/л,

**Изменение биохимических показателей сыворотки крови коз при внутривенном заражении паратуберкулезом
(n = 6; M ± m; p ≤ 0,05)**

№	Показатель	Ед. изм.	Перед заражением		85-е сутки после заражения (перед падежом)		Перед убоем (333 сутки)	
			Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
1	Глюкоза	mmol/l	3,5 ± 0,46	3,2 ± 0,01	3,2 ± 0,01	2,35 ± 0,19*	3,4 ± 0,2	1,2
2	Мочевина	umol/l	7,6 ± 0,4	7,0 ± 0,87	7,0 ± 0,87	14,1 ± 1,15*	8,4 ± 0,47	34,7
3	Креатинин	umol/l	66,2 ± 3,7	76,87 ± 12,5	76,87 ± 12,5	265,5 ± 3,2*	76,87 ± 5,9	654,2
4	Щел. Фосфатаза	Мккат/л	7,2 ± 0,2	7,3 ± 0,4	7,3 ± 0,4	48 ± 2,3*	8,4 ± 0,66	4,7
5	Общий белок	g/l	62,63 ± 2,5	70,5 ± 2,02	70,5 ± 2,02	98,4 ± 0,6*	69,5 ± 3,2	53,6
6	АсТ	IU/L	34,67 ± 1,8	19,2 ± 3,06	19,2 ± 3,06	110 ± 3,9*	26,03 ± 1,7	7,8
7	АлТ	IU/L	32 ± 2,77	25,87 ± 2,36	25,87 ± 2,36	135 ± 2,8*	25,5 ± 3,7	4,3
8	Билирубин общий	umol/l	9,5 ± 0,5	9,3 ± 0,36	9,3 ± 0,36	17,4 ± 1,9*	10,07 ± 0,3	50,3
9	Билирубин прям.	umol/l	0	0	0	1,9 ± 0,2*	0,1 ± 0,1	4,3
10	Холестерин	mmol/l	2,6 ± 0,3	2,3 ± 0,29	2,3 ± 0,29	5,2 ± 1,2*	2,6 ± 0,25	11,5
11	Триглицериды	mmol/l	0,87 ± 0,12	0,5 ± 0,08	0,5 ± 0,08	2,6 ± 0,1*	0,47 ± 0,03	3,9
12	Кальций	mmol/l	2,37 ± 0,12	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,07 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,7
13	Фосфор	mmol/l	2 ± 0	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,28 ± 0,22*	1,7 ± 0,25	3,2
14	Железо	mmol/l	27,33 ± 1,16	21,9 ± 1,65	21,9 ± 1,65	18,92 ± 1,3*	22,6 ± 1,15	10,8

Таблица 5

Изменение биохимических показателей сыворотки крови овец при внутривенном заражении паратуберкулезом

(n = 6; M ± m; p ≤ 0,05)

№	Показатель	Ед. изм.	Перед заражением		85-е сутки после заражения (перед падежом)		Перед убоем (333 сутки)	
			Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
1	Глюкоза	mmol/l	3,3 ± 0,02	3,3 ± 0,3	3,05 ± 0,2	2,93 ± 0,15	3,8 ± 0,14	1,9
2	Мочевина	umol/l	7,5 ± 0,4	7,1 ± 0,12*	7,6 ± 0,14	14,77 ± 0,75*	8,75 ± 0,21	22,4
3	Креатинин	umol/l	63,5 ± 0,7	69,1 ± 7,6	71,6 ± 0,1	225 ± 5,5*	84,4 ± 4,8	741
4	Щел. фосфатаза	Мккат/л	7,1 ± 0,14	7,65 ± 0,57	7,5 ± 0,07	42 ± 1,8*	8,7 ± 0,21	94
5	Общий белок	g/l	60 ± 0,3	64,08 ± 1,7*	70 ± 1,7	86,4 ± 2,2*	63,9 ± 0,7	103,4
6	АсТ	IU/L	34,95 ± 1,9	37,72 ± 2,75	20,8 ± 1,6	66,03 ± 5,5*	24,4 ± 0,02	6,8
7	АлТ	IU/L	27,25 ± 0,07	30,55 ± 3,5	27,35 ± 0,5	69,7 ± 4,8*	25,3 ± 1,2	5,2
8	Билирубин общий	umol/l	9,4 ± 0,14	9,5 ± 0,42	9,9 ± 0,1	17,9 ± 0,9*	9,4 ± 0,14	26,8
9	Билирубин прям.	umol/l	0	0	0	1,2 ± 0,38*	0	3,9
10	Холестерин	mmol/l	2,6 ± 0,14	2,7 ± 0,36	2,1 ± 0,14	3,88 ± 0,2*	2,9 ± 0,14	8,9
11	Триглицериды	mmol/l	0,55 ± 0,12	0,88 ± 0,15	0,63 ± 0,03	2,2 ± 0,3*	0,47 ± 0,03	3,1
12	Кальций	mmol/l	2,4 ± 0,14	2,6 ± 0,3	2,25 ± 0,07	2,15 ± 0,25	2,35 ± 0,07	1,6
13	Фосфор	mmol/l	1,95 ± 0,07	2,08 ± 0,15	1,9 ± 0,06	2,5 ± 0,15*	1,6 ± 0,04	3,1
14	Железо	mmol/l	26,5 ± 0,71	25 ± 2	21 ± 1,41	20 ± 2,3	20,1 ± 1,27	10,2

а к концу опыта их значение выросло в 4,5 раза и в 7 раз соответственно. Концентрация общего белка к моменту завершения опыта падала на 16 %, уровень глюкозы снижался на 61 % у коз и на 42 % у овец.

На протяжении всего опыта наблюдается стойкая тенденция к снижению концентрации кальция и железа, увеличение содержания фосфора в сыворотке крови животных относительно контрольных групп. Так, содержание кальция снизилось у коз на 35%, у овец на 38%, железа снизилось на 68% у коз и на 60% - у овец. Содержание фосфора возросло на 48%. Содержание билирубина на 85 сутки увеличилось на 89 %. К концу опыта почти в 2 раза превышает значение перед заражением.

При исследовании ферментативной активности также наблюдаются значительные изменения в зависимости от стадии и тяжести патологического процесса, в частности, активности щелочной фосфатазы (к 85 суткам ее значение превышало в 5 раз стартовую величину и составляло 48 мккат/л). Также отмечено повышение активности ферментов АсТ (в 2 раза) и АлТ (в 3 раза). На 87 сутки в обеих опытных группах, зараженных внутривенно, произошел падеж 2 козлят и 2 ягнят. У оставшихся выживших животных со 180 суток наблюдается резкое снижение активности щелочной фосфатазы, АсТ и АлТ. К концу опыта их величины по сравнению со стартовыми значениями уменьшились на 38, 78 и 86 % соответственно.

В липидном обмене также отмечены серьезные нарушения. Увеличение концентрации холестерина (у коз – 283%, у овец – 230%) и триглицеридов (у коз – 457%, у овец –252%) в сыворотке крови отмечено к концу опыта.

Отмечено первоначальное повышение содержания общего белка, мочевины и креатинина, что связано с нарушением процессов пищеварения и всасывания под влиянием возбудителя болезни. Нарушается порозность клеточных мембран и белок выходит в кровеносное русло, выделение которого с мочой вызывало нарушение фильтрации в почках и накопление мочевины и креатинина в крови животных, что приводит к интоксикации организма. Нарушение всасываемости в кишечнике приводит к изменению в

минеральном обмене: снижение уровня общего кальция в сыворотке крови объясняется вымыванием кальция из организма, кальцинированию почечных лоханок. Накопление фосфора в крови больных животных приводит к развитию нефросклероза почек и прогрессии воспалительного процесса, что сопровождается повышением концентрации щелочной фосфатазы (на 85 сутки ее уровень превышал в 5 раз таковой перед заражением). Также с развитием воспалительного процесса увеличивается вязкость крови, что сопровождается увеличением содержания глюкозы в сыворотке крови больных животных. Отмечено снижение уровня железа в сыворотке крови и увеличение билирубина. При этом развивается гепаторенальный синдром, приводящий к билиарному циррозу печени и холестазу желчного пузыря и желчевыводящих путей, о котором говорит резкое увеличение АсТ и АлТ в сыворотке внутривенно зараженных животных (к 85 суткам их уровень повышается в 2 и 3 раза соответственно). Об этом же свидетельствует повышение содержания триглицеридов и общего холестерина в сыворотке крови, приводящее к развитию атеросклероза и замещению клеток печени липоидной тканью. Атеросклероз также сопровождается повышением уровня АсТ и снижением концентрации общего кальция в сыворотке крови вследствие отложения его на стенках сосудов, что в конечном итоге приводило к развитию сердечной недостаточности.

Клинически течение болезни характеризуется анемией, прогрессирующей диареей, истощением и, как следствие, обезвоживанием организма, снижением температуры тела, приводящее к падежу по 2 из 3 животных в каждой из этих опытных групп. У выживших козлят и ягнят дальнейшее течение болезни приобретало острую форму, при которой в организме больных животных происходили необратимые деструктивные процессы в печени и ЖКТ, что подтверждается резким снижением концентрации общего белка, а также падением ферментативной активности щелочной фосфатазы, АсАТ и АлАТ, при дальнейшем повышении уровня

билирубина и азотистых соединений (мочевины в 4 раза и креатинина в 7 раз по сравнению с их уровнем перед заражением).

Изменения биохимического состава сыворотки крови козлят и ягнят при пероральном заражении (1-я и 4-я группы) мы отметили только у 6 из 10 животных, и они были менее выражены по сравнению с показателями сыворотки крови животных, зараженных внутривенно. У перорально зараженных животных клиническое течение болезни протекало в хронической форме и характеризовалось незначительным исхуданием и сохранением нормальной температуры тела до конца опыта. Падежа в этой группе животных не наблюдалось.

Результаты проведенных биохимических исследований сывороток крови полностью подтверждаются патологоанатомическими изменениями, выявленными при вскрытии павших на 87-е сутки после внутривенного заражения 2 козлят и 2 ягнят и всех вынужденно убитых опытных и контрольных животных через 11 месяцев после начала опыта. При вскрытии в патологическом материале павших и убитых в конце опыта зараженных внутривенно животных были обнаружены сильно выраженные патологоанатомические изменения.

Острый катар тонкого отдела кишечника, слизистая оболочка тощей и подвздошной кишки утолщена, собрана в поперечные и продольные складки, покрыта вязкой слизью серо-желтого цвета. Просвет кишечника значительно сужен. Брыжеечные узлы увеличены, упруги на ощупь, на поверхности среза имеются светло-серые очаги. Кроме того, у внутривенно зараженных животных обнаружены очаговые поражения легких.

У животных, зараженных алиментарным путем, патологоанатомические изменения не столь выражены и ограничены набуханием лишь некоторых участков тонкого отдела кишечника, увеличены региональные лимфоузлы. Кроме того, у половины животных этих опытных групп патологоанатомических изменений вообще не наблюдалось.

Бактериологические и серологические исследования проведены сотрудниками лаборатории микобактериозов в.н.с., к.в.н. Толстенко Н.Г. и аспирантом Сидорчуком В.А. У коз и овец, зараженных внутривенно, ими был выделен возбудитель болезни *Mycobacterium paratuberculosis*. У животных, зараженных перорально, микобактерии не обнаружено.

4. ВЫВОДЫ

1. Выявлены особенности количественных сдвигов в биохимических показателях сыворотки крови у всех экспериментально зараженных возбудителем *M.bovis* коз. Степень проявления этих изменений находится в прямой зависимости от стадии инфекционного процесса туберкулеза. Наиболее значительные изменения в динамике патологического процесса характеризовались снижением на 8% общего белка и повышением в 1,5 раза уровня креатинина, активности АсТ и АлТ в 2,5 раза, щелочной фосфатазы – в 3,5 раза, содержания триглицеридов – в 4 раза.

2. Установлены количественные колебания биохимических показателей сыворотки крови мелкого рогато скота при экспериментальном заражении возбудителем *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*.

3. В группах животных, зараженных внутривенно, установлены более значительные колебания биохимических изменений сыворотки крови, чем при пероральном заражении. У животных, зараженных внутривенно, содержание общего белка к концу опыта снизилось на 16% при увеличении уровня мочевины и креатинина в 4,5 раза и 7 раз соответственно. К 85 суткам после заражения повышалась активность АсТ, АлТ и щелочная фосфатаза в 3, 4 и 5 раз, а в конце опыта уменьшилась на 76, 78 и 38% соответственно.

4. Основные корреляции количественных изменений биохимических показателей сыворотки крови при туберкулезе и паратуберкулезе заключаются в снижении уровня общего белка, кальция, железа и увеличении концентрации креатинина, мочевины, билирубина, холестерина и триглицеридов.

5. Изменение биохимических показателей сыворотки крови при туберкулезе и паратуберкулезе в динамике развития инфекционного патологического процесса могут служить одним из дополнительных биохимических методов при установлении диагноза и дифференциации микобактериальных инфекций.

5. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРЕДЛОЖЕНИЕ

1. Биохимические исследования сыворотки крови в благополучных и неблагополучных хозяйствах могут служить одним из способов диагностирования инфекций на ранних стадиях развития инфекционного процесса микобактериальных инфекций.

2. Исследования биохимического состава сыворотки крови следует использовать как дополнительный диагностический тест при установлении диагноза и дифференциальной диагностики туберкулеза и паратуберкулеза у мелкого рогатого скота.

3. Материалы биохимических исследований при микобактериозах животных могут быть использованы ветеринарными специалистами при диагностике паратуберкулеза жвачных животных.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Сидорчук В.А. Патогенез экспериментального паратуберкулеза овец и коз / Сидорчук В.А., Сошникова Е.М., Найманов А.Х. [и др.] // Сб. научн. тр. посвящ. 90-летию МГАВМиБ им. К.И.Скрябина. Актуальные проблемы ветеринарной медицины. – 2009. – С. 219 – 222.

2. Овдиенко Н.П. Восприимчивость коз к возбудителю туберкулеза / Н.П. Овдиенко, В.И. Строгонов, Е.М. Сошникова [и др.] // Веткорм. – № 6. – 2009. – С. 26 – 27.

3. Сошникова Е.М. Биохимические изменения крови коз при экспериментальном заражении *M. bovis* / Е.М. Сошникова, Г.И. Устинова, В.И. Строгонов [и др.] // Тр. ВИЭВ. – Москва. – 2010. – т. 76. – С. 115 – 117.

4. Методические наставления по проведению исследований при микобактериозах животных / М.И. Гулюкин, А.Х. Найманов ... Е.М. Сошникова [и др.]// Отделение ветеринарной медицины РАСХН. – Москва, 2012 – 85 с.

5. Проблемы диагностики паратуберкулеза крупного рогатого скота / А.Х.Найманов, Н.Г.Толстенко ... Е.М.Сошникова [и др.] // Веткорм. – 2014. – № 3. – С. 10 – 12.

6. Сошникова Е.М. Динамика биохимических показателей крови при экспериментальном заражении коз *M. bovis* / Е.М. Сошникова, Г.И. Устинова, А.Х.Найманов [и др.] // Веткорм. – № 5. – 2014. – С. 75 – 76.

7. Сошникова Е.М. Динамика биохимических показателей крови при паратуберкулезе мелкого рогатого скота / Е.М.Сошникова, Г.И.Устинова, А.Х.Найманов [и др.] // Веткорм. – 2015. – № 3. – С. 37 – 38.

8. Сошникова Е.М. Сравнительная оценка активности ферментов в сыворотке крови коз при экспериментальном заражении туберкулезом и паратуберкулезом / Е.М.Сошникова, Г.И.Устинова // Труды ВИЭВ. – Т.78. – Москва, 2015.– С. 374 – 381.

Автор выражает глубокую благодарность за оказание научно-методической помощи д.б.н., профессору В.Ф. Полякову, д.в.н., профессору А.Х.Найманову, к.в.н. Толстенко Н.Г., а также к.в.н. В.А. Сидорчуку, к.б.н. С.Н.Степновой, к.в.н В.С.Суворову и к.в.н.О.В. Якушевой за помощь в выполнении отдельных этапов работы.