

АКАДЕМИЯ НАУК КАЗАХСКОЙ ССР  
ИНСТИТУТ ЗООЛОГИИ

На правах рукописи

АНАНЬЕВ ОЛЕГ ПЕТРОВИЧ

УДК 619.616.993.112.636.2

ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА И СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ  
ДИАГНОСТИКА ПРИ ТЕЙЛЕРИОЗЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

(Специальность 03.00.19 - паразитология)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Алма-Ата 1983



Работа выполнена в лаборатории протозоологии и аришно-  
энтомологии Казахского научно-исследовательского ветеринарного  
института Восточного отделения ВАСХНИЛ

Научный руководитель - доктор биологических наук

М.В.Хван

Официальные оппоненты:

1. Доктор биологических наук, профессор Л.П.Дьяконов  
(ВИЭВ)

2. Кандидат биологических наук А.В.Леват  
(Институт зоологии АН КазССР)

Ведущее учреждение - Узбекский научно-исследовательский  
ветеринарный институт

Защита диссертация состоится 28 июня 1983 г. в  
14 часов на заседании Специализированного совета К.008.17.01.  
при Институте зоологии АН КазССР

Адрес института: 480032, г. Алма-Ата, 32, Академгородок,  
Институт зоологии АН КазССР

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института  
зоологии АН КазССР

Автореферат разослан 17 мая 1983 г.

Ученый секретарь Специализированного  
совета, доктор биологических наук

С.М.Пак

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Тейлерриоз – кровопаразитарное заболевание крупного рогатого скота. Он характеризуется высокой смертностью среди заболевших животных и наносит значительный экономический ущерб скотоводству в южных областях Казахстана, заключающийся из потерь от падежа, снижения мясной и молочной продуктивности, нарушенных функций половой сферы.

Основой борьбы с этой инвазией является систематическое планомерное уничтожение клещей–переносчиков путем применения соответствующих акарицидов, недопущение контакта неиммунных животных с инвазированными клещами, ограничение численности популяции клещей в природе путем проведения агрометеорологических мероприятий. Однако отсутствие высокоэффективных средств терапии и профилактики, сложность и высокая стоимость предложенных методов лечения, устойчивость клещей–переносчиков к некоторым акарицидам, сокращение по ряду причин арсенала применяемых акарицидных средств обусловили в последние годы повышенный интерес исследователей к изучению иммунитета при тейлерриозе и разработке методов специфической терапии и профилактики. Разработка методов получения тейлерийных антигенов (А. Schindler, 1968; Н.И. Степанова, 1971) позволила объективно оценивать факторы гуморального иммунитета при тейлерриозе, анализировать антигенную структуру тейлерий разных штаммов (А. Schindler, 1969; Н.И. Степанова, 1977); изучать эпизоологию тейлерриоза.

Однако данные о диагностической ценности серодиммунологических реакций при тейлерриозе малочисленны и противоречивы (А. Schindler, 1968; М.Г. Гуматов, 1968; С.З. Дубовый, 1976; М.И. Тутушди, 1975). До сих пор не решен вопрос о природе иммунитета при тейлерриозе. Исследования в этой области являются необходимой предпосылкой для разработки средств и методов диагностики, профилактики и терапии.

цель исследования. Целью исследований являлось изучение факто-

ров гуморального иммунитета при тейлерриозе и эффективности сероиммунологических методов диагностики этой инвазии.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Приготовить иммунологические реагенты для изучения иммунитета при тейлерриозе.

2. Изучить факторы гуморального иммунитета при экспериментальном и спонтанном тейлерриозе.

3. Определить значимость сероиммунологических реакций при изучении эпизоотологии тейлерриоза крупного рогатого скота.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые в нашей стране изучены: распределение антител по классам иммуноглобулинов посредством непрямой реакции иммунофлюоресценции с флюоресцирующими сыворотками к иммуноглобулинам  $M$  и  $G$  крупного рогатого скота; иммуноглобулиновый ответ в динамике тейлерриозного процесса; доказана возможность ретроспективной диагностики свежих случаев заболевания. Установлены важная роль  $3p$  в осуществлении эффекторных функций иммунной системы в период острого переболевания, сезонность колебания титра антител и паразитаemia у животных в латентной по тейлерриозу зоне. Определены особенности распределения антител у крупного рогатого скота в различных по энзоотичности тейлерриоза зонах. Усовершенствован метод приготовления тейлеррийного антигена для реакции связывания комплемента (РСК) и реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), включающей дезагрегацию пораженных эритроцитов низкочастотным ультразвуком и позволяющий получать активные препараты антигена. Установлены оптимальные сроки для проведения массовых сероиммунологических обследований с целью выявления тейлерриозоносителей и дифференциация мер борьбы с тейлерриозом. Показаны различия в частоте обнаружения и высоте титров антител у крупного рогатого скота в латентной и эпизоотической по тейлерриозу зонах, что дает возможность охарактеризовать степень энзоотичности неблагоприятной по этой инвазии зоны.

Аннотация работы. Материалы по основным положениям работы доложены на Всесоюзной научной конференции "Состояние изученности кровопаразитарных и малоизученных протозойных болезней сельскохозяйственных животных и перспективы их ликвидации в стране" (Самарканд, 1975), на заседании Общества протозоологов Казахстана (Алма-Ата, 1977, 1981), на заседании Общества паразитологов Казахстана (Алма-Ата, 1979).

### ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из "Введения", "Обзора литературы", 13 разделов собственных исследований и описки использованной литературы (123 наименования отечественных и зарубежных авторов). Она иллюстрирована 23 таблицами и 15 рисунками.

### 2. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

#### 2.1. Материалы и методы исследования.

В лабораторных опытах использованы 24 головы крупного рогатого скота алатвуской породы в возрасте от 6 месяцев до 6 лет из местности, благополучной по тейлерозу, 86 кроликов и 120 морских свинок. Для заражения животных использовала инвазированные тейлериями ямаго *H. detritum*, собранные в хозяйствах юга Казахстана и любезно предоставленные из Азербайджанского НИВИ А.Н. Годжаевым для крови остробольных тейлериязом животных. Интенсивность паразитемии определяли на окрашенных по Романовскому мазках крови, просматривая 200 полей зрения микроскопа, и выражали в процентах. Тейлерийные антигены для РСК готовили по методу Н.И. Степановой (1970) и по разработанному нами методу с использованием низкочастотного ультразвука. Хроматографическое разделение антигенов тейлерий проводили методом галь-фльтрации по Г.Детерману (1970) в колодках

1,5 x 80 см или 2,5 x 80 см с сефадексом G - 200. Фракция альбета собирала на хроматографическом коллекторе ЖКОВ - I. Концентрацию белка в пробах альбета определяли по методу *O. Lowry* с соавторами (1951) или при 280 нм на опектрофотометре ОФ - 16.

Реакция непрямои гемагглютинация (РНГА) ставила с обработанными по методу *Filley* и танализованными по *S. Boyden* (1951) или обработанными глицеральдегидом по *D. Mewissen* (1973) и танализованными эритроцитами. В качестве антигена служили :

а) ультразвуковые лизаты тейлерий, выделенных из эритроцитов и очищенные от грубых частиц центрифугированием при 12000 *g* в течение 15 мин;

б) надосадочная жидкость разрушенных ультразвуком и содержащих гранулы тела клеток селезенки или лимфатического узла после центрифугирования при 12000 *g* в течение 15 мин;

в) ультразвуковой лизат из пораженных тейлериями эритроцитов после центрифугирования при 12000 *g* в течение 15 мин;

г) белковые фракции из матер. алл указанного в пунктах "б" и "в", полученные галь-фальтрацией в колонках с сефадексом G - 200.

Имуноглобулины (  $I_g$  )  $M_1$ ,  $G_1$  и  $G_2$  выделяли из сыворотки крови и мазка крупного рогатого скота, взяв за основу методику, описанную *H. Fey* с соавт. (1976). За окончательным анализом, все операции по выделению иммуноглобулинов проводили при комнатной температуре. Разбавленные белковые растворы концентрировали посредством гипертонаического диализа протаз сахарозы для антисывороточного раствора белка в целлофановом мешочке в токе воздуха от вентилятора. Для всех операций использовали реактивы квалификации "х.ч" или "ч.д.в."

Иммунизацию кроликов и морских свинок проводили по методу *H. Fey* с соавт. (1976). Для иммунизации использовали полиый альбумат Фрейнда (ПДФ), приготовленный нами. Эмульгирование альбумата с  $I_g$ , введение антигена и взятие крови от животных проводили по методу *M. Гор-*

вица и М.Шарфа (1972).

Из антисывороток гамма-глобулиновую фракцию выделяли высаливанием насыщенным раствором сульфата аммония при 33 % насыщении. Гамма-глобулин извлекали от примесных антигенов абсорбцией иммуноглобулином противоположного класса или субкласса или адсорбцией иммуносорбентами из противоположных иммуноглобулинов, приготовленных по *S. Avrameas and T. Texlupek* (1969) или А.Маянскому (1976). Очищенный гамма-глобулин хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Конъюгацию гамма-глобулина с флуоресцеин изотиоцианатом проводили по *J. Riggs* с соавт. (1972), конъюгат обессоливали на колонках с сефадексом G - 25, концентрировали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Имуноглобулины и антисыворотки к ним анализировали в реакции диффузионной преципитации в геле (РДП) по методу Н.Зальцман и Б. Мосс (1972) и иммуноэлектрофорезом по *J. Scheidegger* (1955). Титр антисывороток определяли реакцией количественной преципитации по *H. Heidelberger* (1938).

Реакцию простой радиальной иммунодиффузии ставили в модификация, описанной *H. Foy et al.* (1976) или Э.Бэм (1979). Реакция иммунопреципитации и иммуноэлектрофореза проводили в геле агарозы, приготовленной нами по методу М.А.Луцина с соавт. (1970).

Непосредственно реакцию иммунофлуоресценции (ИРИФ) ставили по методике, рекомендованной ВОЗ (1975) для диагностики малярии. Учет результатов реакции проводили на люминесцентном микроскопе МД-2А согласно прилагаемой к нему инструкции. Реакцию сопровождали общепринятыми контролями. Серологические исследования у экспериментально зараженных тейлериезом животных проводили, как правило, через 3-5 дней на протяжении месяца после заражения, в последующем интервал между исследованиями увеличивали до 10-15 дней и более.

Закономерности распределения антигенов и паразитов в зонах с различной степенью энзоотичности тейлериеза изучали путем исследо-

вания сыворотки и мазков крови крупного рогатого скота в Джамбулском районе - Джамбулской, Бугуноком, Сайрамском и Сары-Агачском районах Чимкентской, Чилийском и Сыр-Дарьинском районах Кызыл-Ординской областей. Всего было исследовано 3782 мазка и 4136 проб сыворотки крови. При анализе результатов использовали показатели: средний арифметический титр антител и средний уровень паразитемии по группам животных.

## 2.2. Сравнительная характеристика тейлерийных антигенов для РСК, полученных разными методами.

Сравнительному анализу подвергли 26 серий тейлерийных антигенов, приготовленных из крови и органов 15 больных тейлериезом животных. Сводные данные о серологической активности полученных антигенов приведены в таблице I.

Как видно из таблицы I, наибольшую активность проявлял антиген серии 9, приготовленный с помощью низкочастотного ультразвука. Сравнения антигенов серий 6, 7, 8 показывает, что наиболее активным оказался ультразвуковой антиген серии 8, меньшая активность отмечена у антигенов серий 6 и 7.

Было установлено, что применение ультразвука позволяет получить достаточно активные антигены из эритроцитов с минимальной паразитемией, тогда как при лизисе эритроцитов серным эфиром и дистиллированной водой это удается далеко не всегда (серия 2, 15, 16).

Очевидна зависимость активности получаемых антигенов от степени пораженности используемых для этой цели эритроцитов (серия 3, 8, 9, 24).

Почти у всех приготовленных нами антигенов отмечались в различной степени выраженные антикомплементарные свойства, однако, в случае применения в РСК антигенов с высоким титром (серия 3, 8, 9, 24) этот фактор не оказывал влияния на достоверность получаемых результатов. У всех приготовленных антигенов не отмечен гемотокси-



ческие свойства.

Нашими опытами было установлено, что низкочастотный ультразвук обладает мощным дезагрегирующим действием на эритроциты крупного рогатого скота, в меньшей степени это действие проявляется в отношении тейлерий. При этом оказалось, что при озвучивании 60 мл 50%-ной суспензии эритроцитов при интенсивности ультразвука 2, 4, 6 ампер полный лизис эритроцитов наступает через 120, 30 и 12 сек. Морфология большей части паразитов при этом существенно не нарушается. Активность антигенов, полученных из эритроцитов при указанных режимах озвучивания, была одинаковой.

Учитывая данные Н.И. Степановой (1969, 1970), успешно использовавшей высокочастотный ультразвук для повышения активности антигенов из анаплазм и тейлерий, мы предприняли попытку повысить активность комплементсвязывающего антигена с помощью низкочастотного ультразвука. При этом оказалось, что комплементфиксирующей способностью обладают лишь корпускулы тейлерий, а ультразвуковые экстракты полностью разрушенных тейлерий совершенно неактивны в РСК.

### 2.3. Выделение иммуноглобулинов $M$ , $G_1$ и $G_2$ из сыворотки крови крупного рогатого скота

Выбранная нами методика выделения  $\gamma G$  включала следующие этапы: Диализ сыворотки против 0,01 M ацетатного буферного раствора pH 5,4 в течение суток. Образующийся преципитат осаждали центрифугированием, растворяли и к нему добавляли 0,1 M  $ZnSO_4$  до конечной концентрации 0,025 M, при этом коагулирующий  $\gamma G$  преципитировал и его удаляли центрифугированием, а супернатант нейтрализовали 1%-ным раствором трилона Б, подвергали восходящей гель-фильтрации в колонке с сефадексом G-200 и отбирали фракция восходящей ветви исключаемого пика для иммунизации и использовала в качестве стандарта.

Анализ показал, что чистота препарата  $\gamma G$  для использования его в качестве стандарта при определении  $\gamma G$  методом Манчини недоста-

Таблица I.

Сводные данные о серологической активности  
тейлерийных антигенов

Но- мер жи- во- го	Се- ри- ан- ти- ген	Исходный материал	Па- ра- зи- тар- ная ре- ак- %	Разрушающий агент	Титр ан- тиге- на	Контроль ан- тигена на ан- тикомплемен- тарность, в разведении		Конт- роль антиге- на на гемоток- сичность в разве- дении
						1:5	1:10	
Б/н	I	Кровь	40	Дистил. вода	1:10	++	+	-
Б/н	2	"	40	"	-	++++	++	-
I95	3	"	70	Серный эфир	1:80	++	-	-
I95	4	Л/узел	"	"	1:5	+	-	-
I95	5	Селезенка	"	"	1:10	+++	-	-
	6	Кровь	80	Серный эфир	1:20	+	-	-
	7	"	80	Дистил. вода	1:10	+	-	-
	8	"	80	Ультразвук	1:80	+	-	-
	9	"	48	"	1:160	++	-	-
	10	Л/узел (экстракт)	"	"	-	-	-	-
	11	"	"	"	-	-	-	-
I0	12	Кровь	8	Ультразвук	1:10	+	-	-
II	13	Л/узел (Экстракт)	"	"	-	+++	+	-
3	14	Кровь	-	Серный эфир	-	-	-	-
68	15	"	15	"	-	++++	++	-
215	16	"	35	"	1:5	+	-	-
815	17	"	90	"	1:20	++	-	-
Б/н	18	"	-	"	-	-	-	-
259	19	"	25	Ультразвук	1:20	+++	++	-
259	20	"	25	"	1:20	++++	++	-
259	21	"	25	"	1:20	+++	++	-
259	22	"	25	"	1:20	+++	+	-
258	23	"	70	"	1:40	-	-	-
315	24	"	60	Серный эфир	1:80	++	-	-
259	25	"	25	Ультразвук	1:10	++	+	-
259	26	"	25	"	1:10	++	+	-

точно, поэтому исходная методика *H. Fey* с совт. (1976) была дополнена рехроматографией фракции восходящей ветви исключаемого пика в колонке с сефадексом G - 200. Эта процедура позволила получить иммунохимически чистый  $\gamma G_2$  по данным иммуноэлектрофореза. Чистота полученного препарата оказалась достаточной для использования его в качестве стандарта или иммуногена при получении антисывороток и позволяла получить воспроизводимые результаты.

Большинство исследователей для выделения  $\gamma G_2$  применяют ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозах или сефадексах, используя буферный раствор с низкой ионной силой. В этих условиях  $\gamma G_2$  выходит исключаемым пиком и является относительно чистым. Нами при многократном использовании 0,01 M фосфатного буферного раствора (ФБР) pH 7,4 и ДЭАЭ-целлюлозы получен иммунохимически чистый  $\gamma G_2$ , и мы его с успехом использовали для получения антисывороток, однако он был мало пригоден для использования в качестве стандарта из-за контаминации  $\gamma G_1$ . Поэтому мы прибегли к одно-двух-кратной рехроматографии  $\gamma G_2$  на ДЭАЭ-целлюлозе и использованием вышеуказанного элента. Эта процедура позволяла получить  $\gamma G_2$ , пригодный для использования в качестве стандарта.

В качестве источника для выделения  $\gamma G_2$ , как правило, используют сыворотку молозива. Большинство исследователей для выделения  $\gamma G_2$  применяют ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе в ступенчатом градиенте молярности ФБР или применяют непрерывный градиент молярности ФБР. В наших экспериментах использована методика *H. Fey* с совт. (1976) давала вполне удовлетворительные результаты.  $\gamma G_2$  по данным иммуноэлектрофореза, содержал значительные примеси  $\gamma G_1$  и  $\gamma G_2$  и был с успехом использован в качестве иммуногена для получения антисывороток. Двухкратная рехроматография позволяла получить более чистый препарат, однако примеси  $\gamma G_1$  и  $\gamma G_2$  в нем были, что приводило к получению несколько завышенных данных

в тесте Манчина.

Таким образом, можно отметить, что использованные нами методы выделения позволили получить препаративные количества иммуноглобулинов достаточной чистоты, пригодные для использования их как в качестве иммуногена при получении антисывороток, так и в качестве стандарта при количественном определении иммуноглобулинов методом Манчина.

#### 2.4. Получение активных антисывороток к иммуноглобулинам крупного рогатого скота

Для получения активных антисывороток к иммуноглобулинам крупного рогатого скота необходимой предпосылкой является использование хорошо очищенных препаратов  $\gamma_g$ , применение рациональных методов иммунизации и подбор доноров, хорошо отвечающих на  $\gamma_g$ .

Нами была выбрана методика *H. Fey* с соавт. (1976), включающая двукратную иммунизацию кроликов малыми количествами антигена, смешанного с ЦАФ и позволяющая получить антисыворотки с высоким титром при незначительном содержании контаминирующих антител. Над, в основном, подтверждаем данные авторов. Полученные при этом антисыворотки имели высокий титр антител, достигавший 1,6 мг/мл. В то же время большинство антисывороток от кроликов содержало контаминирующие антитела, которые приходилось удалять нативными иммуноглобулинами опозитных классов и субклассов или иммуносорбентами из них. Наиболее хорошие результаты получены при использовании глютаральдегидных иммуносорбентов (*S. Avramov, T. Terstnyak*, 1969). Применение их в дозе 1 мг на 1 мл истощаемой сыворотки позволило получить специфичные антисыворотки. Нативные препараты  $\gamma_g$  и эмбриональной сыворотки также были хорошими иммуносорбентами, однако их необходимо было титровать для выбора оптимальных соотношений в системе антиген-антитело, с тем чтобы избежать загрязнения антисыворотки, взятым в избытке реагентом. Содержащиеся в кроличь-

их антисыворотках антитела - контеминанты были обусловлены как легкими, так и тяжелыми цепями оппозитных иммуноглобулинов. Поэтому, с учетом сообщения *R. Vinaghi* с соавт. (1967) доказавших, что морские свинки продуцируют антитела только против тяжелых цепей  $Ig$ , мы использовали оригинальную методику автора. При введении 100-300 мкг антигена антисыворотки содержали минимальные примеси антител к  $Ig$  оппозитных классов и субклассов, причем перекрестные реакции были обусловлены антителами к легким цепям.

В первых экспериментах мы не выделяли из антисыворотки гамма-глобулиновую фракцию или  $IgG$ , однако последующие наблюдения привели нас к заключению о необходимости этой процедуры, поскольку агрегирующие при хранении липопротеины мешали при постановке теста Манчини.

Очищенные препараты антисыворотки мы использовали и для получения флюоресцирующих конъюгатов. Титр конъюгированных с ФИТЦ антисывороток при этом составлял 1:2 - 1:6 для анта  $IgM$  сыворотки и 1:8 - 1:32 для анта  $IgG$  сыворотки. В большинстве наших экспериментов мы использовали антисыворотки и иммуноглобулины, хранившиеся при  $-20^{\circ}C$  в течение многих месяцев. Анализ накопленных данных показал, что этот метод хранения обеспечивает сохранение иммунологической активности названных биополимеров.

#### 2.5. Комплексообразующие и вызываемые в НРИФ антитела у крупного рогатого скота при тейлернозе

Антителогенез в динамике тейлернозного процесса изучали у 14 зараженных в эксперименте и 18 естественно инвазированных животных. Некоторых животных подвергали реинвазии.

С целью изучения сдвигов в ответ на введение "спорозоитов" тейлерий и следующей стадии развития - гранатных тел - мы использовали для заражения крупного рогатого скота подсадку инвазированных

клещей *H. detritum* или инокуляцию содержащей гренатные тела тейлерий крови, взятой на высоте паразитемии. В группу естественно переболевших животных были подобраны животные с различной степенью клинической выраженности заболевания.

У животных, инвазированных кровью или через клещей, отмечен схожий иммунологический ответ на заражение. Комплексы связывающие антитела в сыворотке крови, инокулированных инвазированной кровью животных, появлялось несколько раньше температурной и паразитарной реакции. При заражении через клещей антитела появлялись примерно в одно и то же время с температурой и паразитарной реакцией или несколько позднее. Высота их титров варьировала в зависимости от тяжести заболевания. В случае летального исхода антитела выявляли в минимальных титрах (1:5 - 1:20) или не выявляли совсем. При благоприятном исходе титр постоянно нарастал, и у выздоравливающих животных достигал 1:1280 в РСК и 1:2560 в ИРИФ. При субклиническом и легком течении тейлерииоза у молодняка крупного рогатого скота интенсивность антителогенеза была значительно ниже, а титр антител не превышал 1:160, будучи у большинства исследованных в пределах 1:40 - 1:80. Отдельные животные оставались серонегативными.

Сопоставление РСК и ИРИФ показало, что в динамике комплексов связывающих и выявляемых ИРИФ антител отмечается параллелизм. Они появляются вслед за развитием паразитемии и достигают максимального титра в период нормализации клинического статуса переболевших животных.

Параллельным исследованием мазков и сыворотки крови от 305 животных разного возраста в неблагополучных хозяйствах Чимкентской и Кызыл-Ордынской областей установлена большая эффективность ИРИФ для выявления серопозитивных тейлериноносителей. При этом посредством ИРИФ выявлялось до 96 % тейлериноносителей, тогда как в РСК - до 68 %.

Особый интерес вызывают данные по реинвазии бычка № 378 и телки № 10 через 6 месяцев после переболевания. Бычок был реинвазирован тейлериями гетерологичного азербайджанского штамма, а телка - гомологичного южноказахстанского. В то время как 5 интактных животных, зараженных тейлериями азербайджанского штамма, падали или были вынужденно убиты, бычок внешне бессимптомно перенес реинвазию, он прореагировал лишь увеличением паразитемии и небольшим подъемом температуры. Вместе с тем комплементсвязывающие антитела в сыворотке крови этого бычка не обнаружены как до реинвазии, так и после нее в то время как телка прореагировала на повторное введение гомологичных паразитов бурным витителогенезом. Из этого следует, что комплементсвязывающие антитела, вероятно, направлены против антигенных детерминант паразита, не играющих решающей роли в формировании защитного иммунитета.

#### 2.6. Сезонная динамика комплементсвязывающих антител и паразитарной реакции у крупного рогатого скота в латентной по тейлериазу зоне.

Сезонную динамику комплементсвязывающих антител и паразитемию изучали в совхозах "Бадамский" и "Караспайский" Бугунонского района Чимкентской области. Исследованиями были охвачены три возрастные группы крупного рогатого скота. К началу исследований первую группу составляли 40 телок в возрасте от 3 до 5 месяцев, вторую - 57 телок в возрасте от 1 года до 1,5 лет, третья - 52 коровы разного возраста.

У животных всех групп в апреле, мае и сентябре сыворотку крови исследовали по РСК, в мазках крови учитывали паразитемию. В летнее время у этих животных определяли эклиазовенность.

В апреле по РСК положительно реагировало 64,9 % телок и 46,1% коров. Тейлериазонителями являлась 75,4 и 100 % животных соответственно. В июле, в сезон массового нападения клещей-переносчиков

на животных, по РСК реагировало положительно 24,5 % телят, 95,2 % телок и 97,5 % коров. В сентябре по РСК реагировало 57,9 % телят и 85 % телок и коров, тейлериноносителями являлись 57,9 % телят и все телки и коровы. В июле на одном животном обнаруживала до 37 имаго.

Летом и осенью титр антител и паразитемия у телок и коров, как правило, значительно возрастает по сравнению с весенним периодом. Минимальные средние показатели титра антител (1:5) по группе коров и телок отмечены в апреле, максимальные - в июле (у телок - 1:40, у коров - 1:35), в сентябре они снизились у телок до 1:25, у коров до 1:15. В весенний период титры варьировали от 1:5 до 1:10, в летний - от 1:5 до 1:160, в осенний - от 1:5 до 1:40.

С увеличением титра комплементсвязывающих антител возрастает и паразитарная реакция. Минимальные показатели ее у телок в среднем по группе наблюдались в апреле (57 тейлерий в 200 полях зрения микроскопа), в июле она достигала показателя 67 тейлерий, а в сентябре - 105 тейлерий.

У коров эти показатели весной, летом и осенью составляли 15, 46 и 43 тейлерия соответственно.

У большинства телок и коров наблюдался параллелизм в динамике титра комплементсвязывающих антител и паразитарной реакции. Повышение титра комплементсвязывающих антител и паразитарной реакции произошло в летнее время, в сезон массового паразитирования клещей на животных.

Следовательно показатели титра комплементсвязывающих антител и паразитарной реакции связаны с реинвазией животных *Th. annulata* через имаго *H. detritum*.

У телок отмечены более высокие показатели интенсивности паразитемии и титра комплементсвязывающих антител, нежели у коров.

В анамнезе у коров - многократно перенесенная реинвазия, тел-



ки после переболевания реинвазировались впервые. Это дает основание полагать, что многократно реинвазированные животные имеют более напряженный иммунитет, за счет чего паразитемия у них выражена слабее.

## 2.7. Паразитемия и антитела у крупного рогатого скота в различных по энзоотичности тейлерииоза зонах

Наличие тейлерийных антител и паразитемия изучали в 5 районах Джамбулской, Чимкентской, Кзыл-Ординской областей - в хозяйствах с различной степенью энзоотичности по тейлерииозу. Были исследованы мазки крови и пробы сыворотки от 1386 животных различного возраста

Результаты паразитологического и серологического обследования на тейлерииоз оказались различными в зависимости от степени энзоотичности зоны. В латентной зоне характерным является высокая частота серопозитивных сывороток у животных с подтвержденной паразитемией. Наибольший средний арифметический титр комплементсвязывающих антител по группе животных 1:70 - 1:56 отмечен у животных в возрасте до 6 месяцев, имеющих в анамнезе недавнее переболевание тейлерииозом. У животных старших возрастных групп установлен более низкий средний арифметический титр - 1:40 он был у животных в возрасте от 6 мес. до 2 лет; самый низкий титр 1:30 - 1:35 был у коров. В хозяйствах латентной зоны все животные переболевали тейлерииозом в первые два года жизни. Положительные показания РСК у паразитоносителей в хозяйствах латентной зоны отмечались в летний период у 94,5 - 100% животных, снижаясь осенью до 80 %.

У тейлериионосителей в энзоотической зоне титры антител были значительно ниже. В возрастной группе до 6 месяцев они составляли 1:20, у коров - 1:10. Процент серопозитивных тейлериионосителей у животных старше трех лет не превышал 40.

Более демонстративны различия в результатах паразитологического обследования. Так, все животные старше 2-3 лет в латентной зоне

являлись тейлерионосителями, в эпизоотической зоне тейлерионосительство установлено у 50 % коров. В возрастной группе 1,5-2 года в латентной и эпизоотической зонах тейлерионосителями являлись соответственно 100 и 6,7 % животных. Из этого следует, что молодые животные являются более пригодным объектом для оценки различий в частоте передачи тейлерииоза в латентной и эпизоотической зонах.

#### 2.8. Изучение диагностической ценности РНГА при тейлерииозе

Применяющиеся в настоящее время иммунологические реакции резко различаются по своей чувствительности. Одной из наиболее чувствительных, простой по технике постановки и большой пропускной способности является реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА).

Поскольку РНГА при тейлерииозе (*Th. annulata*) еще никак не применялась, мы попытались изучить возможность применения этого теста для диагностики тейлерииоза. Всего для РНГА приготовлено 65 серий диагностикума.

В ходе экспериментов выявилась очевидная непригодность для применения в качестве сенситива ультразвуковых экстрактов из тейлерий, выделенных из эритроцитов с помощью серного эфира и дистиллированной воды и обладающих комплементсвязывающей активностью. Также непригодными для сенсibilизации оказались и циточные ультразвуковые экстракты пораженных тейлериями эритроцитов и клеток селезенки.

Допуская возможность контаминации антигенов паразита и избирательной сорбции на эритроцитах антигенно неактивных белков хозяина или паразита, нами ультразвуковые лизаты пораженных эритроцитов и клеток селезенки подвергнуты колоночной гель-хроматографии

на сефадксе G-200 для разделения лизатов на индивидуальные компоненты в соответствии с их молекулярным весом. Для хроматографии использовали лизаты, хранившиеся при  $-10^{\circ}\text{C}$  в течение 30 дней.

Фракция № I из лизата пораженных эритроцитов быка с паразитемией 60 % и фракция № 7 из лизата пораженных тейлериями клеток селезенки оказались активными при использовании их в качестве сенсиitivа. Полученная аналогичным образом фракция № I из лизата эритроцитов с паразитемией 25 %, оказалась также неактивной. Титр геммагглютининов в использованных сыворотках колебался от 1:20 до 1:160, что, примерно, соответствовало титру комплементсвязывающих антигенов.

Фракция № I из лизата эритроцитов была активной также в РСК в титре 1:4.

Приведенные материалы свидетельствуют о принципиальной возможности использования РНГА для серологической диагностики тейлерриоза. Вместе с тем они демонстрируют трудности приготовления эритроцитарного диагностикума для РНГА.

Очевидна непригодность озвученного комплементсвязывающего антигена и цельных ультразвуковых экстрактов пораженных тейлериями эритроцитов и клеток селезенки для сенсибилизации бараньих эритроцитов.

Применение гель-хроматографии позволяло получить антигенно активные фракции, пригодные для приготовления эритроцитарного диагностикума для РНГА.

### 2.9. *YgM* и *YgG* флуоресцирующие антитела при экспериментальном и спонтанном тейлерриозе крупного рогатого скота

динамику тейлерийных антител, относящихся к M-и G классам *Yg*, изучали в опыте на 4 телятах в возрасте 5-6 месяцев. Телят заразили тейлериями через инъецированных ил.ого *H. detritum* путем подсадки 15 пар клещей на мошонку. Все животные заразились тейлерриозом и де-

реболела с типичной для данного заболевания картиной. У телят со дня подсадки клещей, через каждые 3-4 дня на протяжении месяца и через каждые 10 дней в последующие 2 месяца исследовали сыворотку крови в НРИФ. Для реакции использовали приготовленные нами конъюгированные с ФИТЦ антисыворотки к  $\gamma_{M}$  и  $\gamma_{G}$  крупного рогатого скота.

Первое появление  $\gamma_{M}$  антител в титре 1:20 отмечено на 28-32 дни после подсадки клещей. В дальнейшем титр антител повышался незначительно и не превышал 1:80. К концу исследований, на 82 день после заражения,  $\gamma_{M}$  антитела выявлялись в титре 1:20 - 1:40.  $\gamma_{G}$  антитела появлялись позднее на 32-42 дни после заражения в титре 1:20 - 1:80, в последующем титр их возрастал до 1:1280 и к заключительному исследованию на 82 день после заражения титры варьировали от 1:640 до 1:1280.

Распределение тейлерийных антител, относящихся к М и G классам у впервые переболевших и реинвазированных животных, изучали осенью на 100 пробах крови, полученных от 50 голов молодняка в возрасте до 1 года и 50 проб от коров различного возраста в совхозе "Карсапский" Бугуносского района Чимкентской области. Данное хозяйство по существующей классификации относится к латентной по тейлериевой зоне. Из 50 сывороток крови телят в НРИФ с анти  $\gamma_{M}$  положительно реагировало 16, а анти  $\gamma_{G}$  - 24. Титры в НРИФ с анти  $\gamma_{M}$  варьировали от 1:20 до 1:80, в НРИФ с анти  $\gamma_{G}$  от 1:20 до 1280.

При исследовании сывороток крови от коров в НРИФ с анти  $\gamma_{M}$  положительные результаты в титре от 1:20 до 1:40 получены в двух случаях, в НРИФ с анти  $\gamma_{G}$  положительными были 40 сывороток с титром от 1:20 до 1:640.

Этими исследованиями было установлено, что в динамике тейлериезного процесса у крупного рогатого скота первыми появляются  $\gamma_{M}$  антитела,  $\gamma_{G}$  антитела появляются на 4-10 дней позднее. Для боль-

шинства переболевших тейлериезом животных характерно наличие антител, относящихся как к  $IgM$ , так и к  $IgG$ . У реинвазированных животных в подавляющем большинстве регистрируются антитела  $IgG$  класса.

## 2.10. Динамика иммуноглобулинов $M$ , $G_1$ и $G_2$ при экспериментальном тейлериезе крупного рогатого скота

Количественное определение  $IgM$ ,  $IgG_1$  и  $IgG_2$  проводили у 6 бычков в возрасте 1,5-2 года. Их заразили инвазированной кровью с паразитемией 53% от больного тейлериезом быка. Все животные переболели с типичной для тейлериеза клинической картиной. Три бычка болели крайне тяжело и пали на 22-25 дни после заражения. Максимум паразитемии колебался в пределах 27-43%. Остальные выздоровели без лечения.

Исследования показали, что заболевание сопровождается значительными колебаниями уровней  $Ig$ . Наиболее резкие колебания были характерны для  $IgG_2$ . После заражения по мере развития болезни уровень  $IgG_2$  повышался на 24-30%, совпадая по времени с максимумом паразитемии. Иная картина отмечена у павших животных, у них отмечалось увеличение  $IgG_2$  на 5-7 дни после заражения, затем содержание  $IgG_2$  значительно снижалось и за день до смерти составляло 44-89% от исходного уровня.

Колебания  $IgM$  были менее выражены, однако у павших животных за день до смерти количество  $IgM$  снизилось на 12-18%, у выживших максимальный подъем превышал исходный уровень на 9-25% и отмечался через 1,5-2 месяца после заражения. Сходная динамика отмечена у  $IgG_1$ , однако снижение концентрации  $IgG_1$  перед смертью животных было менее выражено, некаки для  $IgM$ . У выживших животных незначительное повышение уровня  $IgG_1$  отмечалось через 1,5-2 месяца после заражения.

Исследования показали, что для иммуноглобулинового ответа

при тейлерииозе характерна гетерогенность, что вероятно, объясняется различной ролью иммуноглобулинов  $\mu$ ,  $\sigma_1$  и  $\sigma_2$  в динамике инвазионного процесса. Так, при острой фазе тейлерииозе в иммунный ответ наиболее интенсивно вовлекаются  $\gamma\sigma_2$ , тогда как у тейлериионосителей характерным является повышенный синтез  $\gamma\mu$ . Несмотря на отрицательные результаты в большинстве экспериментов по пассивному переносу иммунитета к тейлерииозу, полученные данные указывают на важную роль иммуноглобулинов при этом заболевании, поскольку изменения в содержании  $\gamma$ , особенно  $\gamma\sigma_2$  в острой фазе болезни позволяют судить о тяжести заболевания и прогнозировать исход.

## В Ы В О Д Ы

1. Из испытанных способов разрушения пораженных тейлериями эритроцитов, обеспечивающих получение активных тейлерийных антигенов, лучшим является дезинтеграция их ультразвуком низкой частоты или лазерным серным эфиром.

2. Ультразвуковые волны частотой 22 кгц обладают сильным дезинтегрирующим действием на пораженные тейлериями эритроциты, в меньшей степени это действие проявляется на тейлерий.

3. Активность тейлерийных антигенов, полученных с помощью ультразвука, зависит от степени пораженности эритроцитов тейлериями, а также от степени разрушения их ультразвуком. Чем сильнее выражена паразитарная реакция крови, используемой для получения эритроцитов, тем активнее антигены. Наибольшей комплементсвязывающей активностью обладают антигены из тейлерий, разрушенных до состояния корпускул; дальнейшее озвучивание корпускул резко снижает активность антигенов, вплоть до полной ее потери.

4. Методами высаливания, диализа, гель-фильтрации, ионообменной хроматографии и иммуносорбции выделены иммуноглобулины крупно-

го рогатого скота и приготовлены моноспецифичные антисыворотки к ним.

5. Переболевшие крупного рогатого скота тейлериезом сопри-  
касается образованием выявляемых в РСК, ИРИФ и РНГА антител, время  
появления и титр которых зависит от способа заражения, используемо-  
го штамма тейлерий и клинического проявления заболевания.

6. В иммунный ответ при тейлериезе вовлекаются иммуноглобули-  
ны  $M$ ,  $G_1$  и  $G_2$ . В динамике болезни наиболее значительно меняется  
содержание  $IgG_2$ , что, вероятно, отражает его важную роль в форми-  
ровании иммунитета.

7. Тейлерийные антитела относятся к  $M$  и  $G$  классам иммуно-  
глобулинов. В динамике болезни первыми появляется  $IgM$  антитела,  
однако их продукция незначительна и кратковременна.  $IgG$  антитела  
появляются вслед за  $IgM$  и длительно циркулируют в крови переболев-  
ших животных.

8. Содержание антител в сыворотке крови естественно переболев-  
ших тейлериезом животных подвержено сезонным колебаниям. Наибольший  
их титр отмечается летом и совпадает по времени с массовым парази-  
тированием имаго клещей-переносчиков тейлериеза. Аналогичная законо-  
мерность отмечается и в динамике паразитарной реакции.

9. Диагностическая ценность РСК и ИРИФ неодинакова в разные се-  
зоны года; с их помощью летом выявляется до 95,2-100 % тейлериеноси-  
телей, осенью до 80-85 %, весной до 46,1-64,8 %.

10. Доказана возможность применения РНГА для выявления антител  
в сыворотке крови больных и переболевших тейлериезом животных. Анти-  
геном для сенсибилизации бараньих эритроцитов служат белковые фрак-  
ция, выделенные путем гель-фильтрации из ультразвуковомытых эритро-  
цитов пораженных тейлериями эритроцитов или лимфоцитов крупного  
рогатого скота.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. При уточнения эпизоотической ситуации в неблагополучных по тейлерриозу крупного рогатого скота зонах (хозяйствах) и более полному выявлению переболевших тейлерриозом животных следует исследовать сыворотку их крови в августе-сентябре с помощью РСК и НРИФ.

2. При постановке РСК необходимо использовать метод микротитрования, позволяющей уменьшить расходы ингредиентов реакции и ускорить исследование.

3. Тейлерийные антигены для РСК следует готовить из пораженных тейлериями эритроцитов, разрушая их ультразвуковыми волнами частотой 22 кгц с помощью отечественного низкочастотного дезинтегратора УЗДН-1.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. АНАНЬЕВ О.П. Динамика комплементсвязывающих антител у крупного рогатого скота при экспериментальном и спонтанном тейлерриозе. В кн. "Материалы к республиканскому семинару-совещанию по борьбе с паразитарными болезнями животных". Алма-Ата, 1974, с.23-24.

2. АНАНЬЕВ О.П. Сравнительное изучение тейлерийных антигенов в реакции связывания комплемента. Там же, с. 25-26.

3. АНАНЬЕВ О.П. Сезонная динамика комплементсвязывающих антител и паразитарной реакции у тейлеррионосителей в латентной зоне юга Казахстана. Тр. КазНИВИ, т. XVI, Алма-Ата, 1976, с. 271-275.

4. АНАНЬЕВ О.П. Сравнительное изучение свойств тейлерийных антигенов серологическими методами. Там же, с. 275-278.

5. АНАНЬЕВ О.П. Паразиты и тейлерийные антитела у крупного



рогатого скота в латентной и эпизоотической по тейлерриозу зонах. В кн. "Паразитарные болезни сельскохозяйственных животных и борьба с ними", Алма-Ата, 1979, с. 108-109.

6. АНАНЬЕВ О.П., ЗУЕВ В.В., ХВАН М.В. Получение и характеристика лимфоцитарных антисывороток против иммуноглобулинов м, G крупного рогатого скота. В кн. "Инфекционные и незаразные болезни сельскохозяйственных животных в Казахстане". Алма-Ата, 1979, с. 125-128.

7. ХВАН М.В., АНАНЬЕВ О.П. Динамика  $IgM$  и  $IgG$  антител при тейлерриозе крупного рогатого скота. В кн. "Иммунопрофилактика, патогенез и эпизоотология паразитов сельскохозяйственных животных". Алма-Ата, 1981, с. 142-144.

8. ХВАН М.В., АНАНЬЕВ О.П., ЗУЕВ В.В. Иммуноглобулины и антитела при тейлерриозе и безноотрозе крупного рогатого скота. Вильнюс, 1982, с. 377.