

УДК 619:616.98:579.873.21:616-07

А.П. ЛЫСЕНКО, А.П. ЛЕМИШ, И.Н. АРХИПОВ,
РНИУП "Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского",
А.Н. ПРИТЫЧЕНКО,
УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины"

ИЗУЧЕНИЕ ПРИЧИН ТУБЕРКУЛИНОВЫХ РЕАКЦИЙ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ПРИМЕНЕНИЕМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА И БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ ВКГ

SUMMARY

The received results testified to communication of reactions on tuberculin in herd with infectid animals the activator of a tuberculosis, most possibly, a tuberculosis. It is impossible to consider it as a unusual occurrence. Earlier it has been established, that in 6 of 7 surveyed problem facilities of republic at reacted cows higher credits of antibodies are noted to M.tuberculosis. Simultaneous research in ELISE blood of animals and the attendants has allowed to find out communication of reactions on PPD tuberculin, activation of an infection in cattle breeders and presence at them contacts with bacilli patients.

Реагирующие на туберкулин коровы выявляются во многих благополучных по туберкулезу стадах. На "парааллергические" реакции обратили внимание уже в 20-х годах XX столетия, после первых успехов в борьбе с туберкулезом (1). Как правило, их связывают с инфицированием атипичными микобактериями, но нельзя исключить, что они могут быть обусловлены и латентной туберкулезной инфекцией (2). Проблема актуальна как с точки зрения выбытия продуктивных животных, так и возможных вспышек болезни и передачи возбудителя человеку.

Несмотря на появление новых диагностических методов, еще не сложилось четких подходов к раннему выявлению туберкулезной инфекции и прогнозированию возможной активизации (3).

Раннее бактериологическое выявление туберкулезной инфекции ограничено низкой чувствительностью общепринятых методов (4). Более информативен поиск иммунологических маркеров туберкулезной инфекции, в частности, с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) (3, 5).

Некоторые модификации непрямого ИФА с учетом особенностей персистенции возбудителя обеспечивают высокую чувствительность и специфичность их выявления. В первую очередь это касается определения в крови не только антител, но и микобактериальных антигенов, появление которых связано с персистенцией возбудителя туберкулеза (5, 6, 7).

Бактериологическое подтверждение результатов ИФА, как и других методов, не представляет трудностей у явно больных особей, но при латентной инфекции у крупного рогатого скота необходимо использование

методов, позволяющих выявлять трансформированные формы возбудителя.

Разработка новой питательной среды ВКГ (8), позволяющей с высокой чувствительностью и с минимальными затратами времени выделять возбудитель туберкулеза и его измененные формы, существенно расширила возможности прижизненного бактериологического подтверждения результатов иммунодиагностики (9).

Цель работы: изучение причин туберкулиновых реакций у коров благополучного стада на основе выявления в крови антител, микобактериальных антигенов, иммунных комплексов, бактериологических и патоморфологических маркеров туберкулезной инфекции.

Материалы и методы. В течение 4 лет 700 коров благополучного стада исследовали ППД-туберкулином для млекопитающих и комплексным аллергеном из атипичных микобактерий (КАМ). В пробах крови (1:50) коров, реагирующих с оценкой "+" и "=" в ИФА определяли:

- уровень антител к *M.bovis*, *M.tuberculosis*;
- способность антител реагировать с антигенами *M.bovis* и антигенами атипичных микобактерий в жидкой фазе реакции (ΔБА);
- уровень микобактериальных антигенов и их комплексов с антителами (по влиянию не разведенных проб крови на активность кроличьей антисыворотки *M.bovis*) (6, 7).

Для ИФА использовали соникаты клеточных стенок *M.bovis* и *M.tuberculosis* (1—4 мкг на лунку) (6). Реакцию ставили в непрямом варианте, по общепринятой схеме, с использованием пероксидазных конъюгатов с кроличьими IgG к IgG быка и козьих IgG к IgG кролика (Sigma).

Таблица 1

Уровень и специфичность антимикобактериальных антител в ИФА у реагирующих на туберкулин коров (январь 2002 г.)

Результаты ИФА интерпретировали только при получении на каждой панели соответствующего результата контрольных проб: пула сывороток крови здоровых коров, бычьей антисыворотки к смеси антигенов атипичных микобактерий, сыворотки крови коровы, спонтанно больной туберкулезом.

Пробы крови от 14 реагирующих животных посеяли на питательную среду ВКГ "Hansa", Киев. Для деконтаминации кровь обрабатывали 3-хлоргексидином, смешивали (1:1) со стимулятором роста ВКГ, инкубировали 24 ч при 37 °С, высевали по 0,3—0,5 см³ на разовые чашки Петри со средой ВКГ и инкубировали при 37—38 °С до 7 суток. Выросшие культуры исследовали в реакции агглютинации (РА) с нормальной сывороткой и антисывороткой к бациллярным антигенам *M. bovis*, *M. tuberculosis*.

Часть ВКГ-изолятов исследовали в ПЦР с набором "ДНК-технологии" по методике изготовителя. Патогенность определяли на морских свинках (по 2 мг внутривенно).

Лимфатические узлы от реагирующих коров исследовали бактериологически по общепринятой методике.

Материал от коровы 882/14 исследован гистологически с окраской срезов гематоксилин-эозином и по Брассе.

Результаты исследований. При первом исследовании (2002 г.) у 8 из 9 коров (88,9%), реагирующих в симультанной пробе, уровень антител в ИФА к комплексу антигенов *M. bovis* был повышен в 1,6—2,0 раза. Сыворотки крови 2 коров (22,2%) на 20—90% интенсивнее реагировали с антигенами *M. tuberculosis* (табл. 1). У 6 (66,7%) животных антитела в жидкой фазе интенсивнее реагировали (Δ БА) с антигенами *M. bovis*, чем с антигенами атипичных микобактерий. Эти данные указывали на высокую вероятность инфицирования коров микобактериями туберкулеза млекопитающих, возможно *M. tuberculosis*, но результаты бактериологического посева лимфатических узлов на яичные среды и биопробы были отрицательными.

№ коровы	Δ ОП с антигеном <i>M. bovis</i> ¹	Δ БА ²	Δ M. tuberculosis/ <i>M. bovis</i> ³
6035\1	1.7	1.7	0.93
9750\2	1.7	0.5	1.0
9482\3	2.0	3.5	0.9
6436\4	2.0	0.5	0.5
9382\5	1.9	5.0	0.3
9060\7	1.6	5.0	1.2
9516\8	2.0	1.4	1.17
6426\9	1.2	3.5	1.9
9236\10	2.0	1.5	1.1
Контрольные сыворотки			
Нормальная (пул)	1.0	1.1	1.05
К антигенам атипичных микобактерий	1.3	1.0	0.68
Коровы, больной туберкулезом	1.9	7.0	1.1

Примечания к таблицам 1—3:

Δ ОП¹ — отношение оптической плотности (ОП) исследуемой сыворотки к ОП пулу сывороток здоровых коров;

Δ БА² — отношение уровня снижения ОП исследуемой пробы в растворе с антигенами *M. bovis* к уровню снижения ОП пробы в растворе с антигенами атипичных микобактерий;

Δ M. tuberculosis/*M. bovis*³ — отношение ОП исследуемой пробы в лунках с антигеном *M. tuberculosis* к ОП исследуемой пробы в лунках с антигеном *M. bovis*;

— черным шрифтом выделены позитивные результаты.

Выделение реагирующих коров продолжалось осенью 2002 г. (таблица 2). Уровни специфических антител у таких животных оказались на 10—50% выше, чем в пуле сывороток здоровых коров. По показателю Δ БА, который отражает как способность антител связывать в жидкой фазе антигены микобактерий, так и уровень антител в иммунных комплексах, 13 (86,7%) из 15 коров можно было считать инфицированными возбудителями туберкулеза. Это подтверждали и результаты ИФА по определению микобактериальных антигенов и их иммунных комплексов (6 позитивных и 5 сомнительных проб — 73,3%).

Таблица 2.

Уровень антител, микобактериальных антигенов и иммунных комплексов в ИФА у реагирующих на туберкулин коров (ноябрь 2002 г)

№ коровы	ΔОП с антигеном <i>M. Bovis</i>	ΔБА	Ингибция тест-антисыворотки в % ¹
653111	1.5	1.2	-42%
606912	1.3	0.5	-35%
621613	1.2	3.5	-23%
664514	1.1	1.7	-30%
621115	1.3	3	-20%
574816	1.2	2	+27%
663317	1.1	5	-23%
680618	1.2	3	-29%
608019	1.3	5	-35%
6297110	1.1	3	-24%
6887111	1.1	5	-11%
7994112	1.2	5	-24%
6552113	1.1	5	-11%
6421114	1.2	5	-13%
6738115	1.2	5	-13%
Контрольные сыворотки			
Нормальная (пул)	1.0	0,65	0.5
К антигенам атипичных микобактерий	1.3	1.0	+20%
Коровы, больной туберкулезом	1.4	6,0	-59%

Примечание:

¹ — процент снижения ОП кроличьей антисыворотки *M. bovis* после внесения в нее исследуемой пробы, характеризует уровень микобактериальных антигенов и иммунных комплексов.

В 2005 г. кровь 10 реагирующих и 4 туберкулинотрицательных животных исследовали в ИФА и посеяли на питательную среду ВКГ (табл. 3). Установлено, что пробы всех туберкулин-положительных (100%) и 66,7% коров со слабыми реакциями на туберкулин (2 мм) через 2—4 суток после посева на среду ВКГ дали рост "парафиновых" колоний. Из 4 туберкулинотрицательных коров рост был получен в 1 случае (25%).

В мазках ВКГ-изолятов при окраске по Циль-Нильсену обнаружены синие палочки и кокки (рис. 1), агглютировавшиеся в РА антисывороткой к *M. bovis*, *M. tuberculosis* (табл. 3).

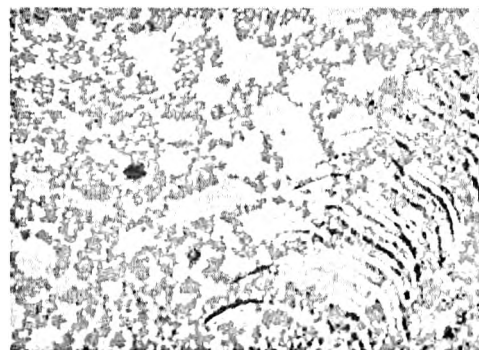


Рис. 1. ВКГ-изолят из крови коровы 427/2 (окраска по Циль-Нильсену).

В мазках ВКГ-изолята из крови коровы 882/14 (рис. 2) были обнаружены синие и красные палочки в составе одних и тех же цепей, а также красные кокки. Именно в этой пробе крови отмечен самый высокий уровень микобактериальных антигенов (ингибция в ИФА — 54%).

Таблица 3

Бактериологическое и серологическое исследование крови реагирующих на туберкулин коров (2005 г.)

№ коровы	Рост на среде ВКГ	Микроскопия изолятов (по Циль-Нильсену)	РА изолятов с а-с <i>M. bovis-tuberculosis</i>	Исследование крови в ИФА		
				ΔОП	ΔБА	Уровень ингибции в %
Реагирующие на туберкулин (3—8 мм)						
2734/1	+	Синие палочки и кокки	++++	не исслед.	-	-
427/2	+	Синие палочки и кокки	+++	1.5	3	-42
373/3	+	Синие палочки и кокки	+++	не исслед.	-	-
884/6	+	Синие палочки и кокки	++++	1.8	0.4	-35
315/8	+	Синие палочки и кокки	++++	не исслед.	-	-
823/11	+	Синие палочки и кокки с рубиново-красными элементами	+++	2.3	0.3	-23
816/12	+	Синие палочки и кокки	+++	не исслед.	-	-
Со слабыми реакциями на туберкулин (2 мм)						
864/4	+	Синие палочки и кокки	+++	0.9	3	-
796/13	-	-	-	не исслед.	-	-
882/14	+	Синие и красные палочки и кокки	++++	1.9	0.7	-54
Не реагирующие на туберкулин						
188/5	-	-	-	1.2	3	-40
426/7	+	Синие палочки и кокки	++++	не исслед.	-	-
685/9	-	-	-	2.0	5	+24
243/10	-	-	-	1.3	5	-

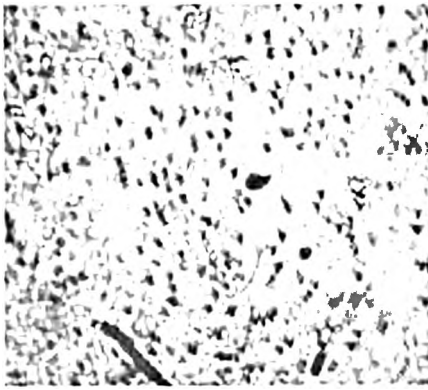


Рис. 2. ВКГ-изолят из крови коровы 882/14 (окраска по Циль-Нильсену).

Исследование изолята 882/14 в ПЦР подтвердило его принадлежность к комплексу *M. bovis*, *M. tuberculosis* (рис. 3). Однако морские свинки, зараженные ВКГ-культурами, остались клинически здоровыми в течение 4 месяцев (срок наблюдения) и на вскрытии не имели выраженных патологических изменений.

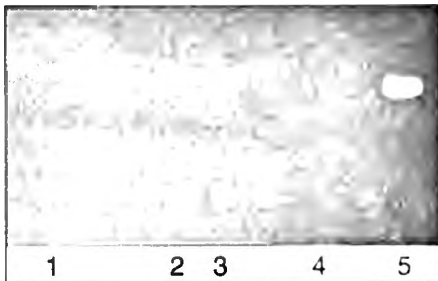


Рис. 3. Результат ПЦР. 1 — изолят 882/14, 2 — *M. tuberculosis* H37Rv, 3 — *M. bovis* 8, 4 — K-, 5 — K+.

Исходя из полученных результатов, были даны рекомендации провести профосмотр животноводов. В конце 2005 г. был выявлен больной туберкулезом скотник, работавший на ферме более 4 лет.

При гистологическом исследовании у коровы 882/14 в лимфоузлах были выявлены очаги склероза и лимфоидно-клеточные скопления вокруг них (рис. 4), плазмоцитарная реакция и активная бласттрансформация лимфоцитов (рис. 5, 6), атрофия лимфоидных узелков, лимфоидно-макрофагальные пролифераты в стенках кровеносных сосудов (рис. 7, 8).

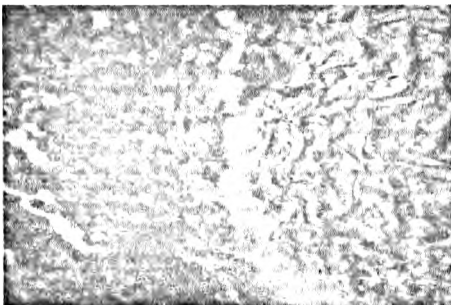


Рис. 4. Очаговый склероз и лимфоидно-клеточные скопления вокруг него (x160).

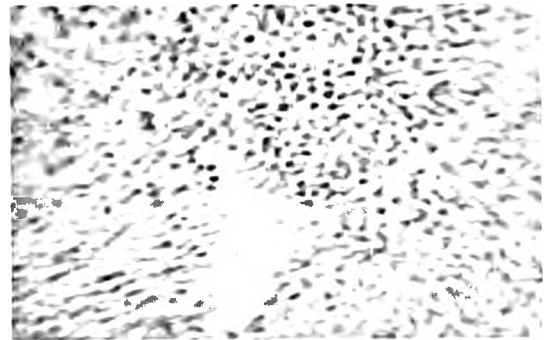


Рис. 5. Плазмоцитарная реакция (x80).

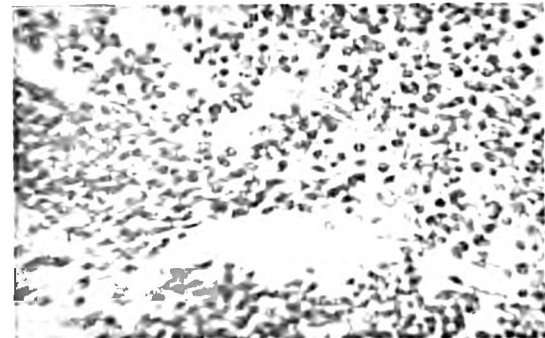


Рис. 6. Активная бласттрансформация лимфоцита (x160).

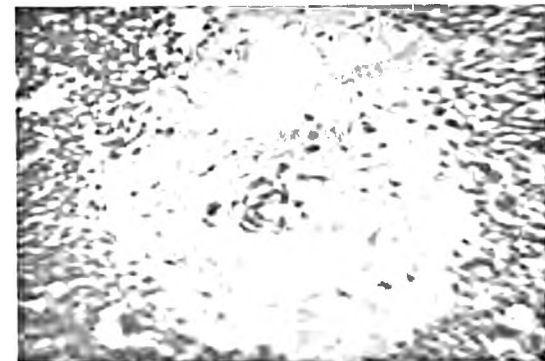


Рис. 7. Атрофия лимфоидного узелка (x80).

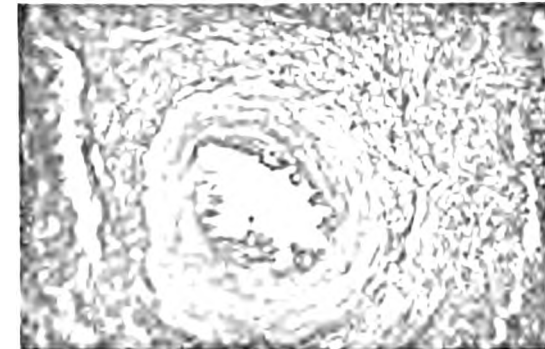


Рис. 8. Лимфоидно-макрофагальные пролифераты в стенке кровеносного сосуда (x80).

Обсуждение результатов. Полученные результаты свидетельствовали о связи реакций на туберкулин в связи с инфицированием животных возбудителем туберкулеза, наиболее вероятно, *M. tuberculosis*. Нельзя считать это редким явлением. Ранее было установлено, что 6 из 7 обследованных проблемных хозяйств республик и реагирующих коров более высокие титры анти

отмечены к *M.tuberculosis* (10). Одновременное исследование в ИФА крови животных и обслуживающего персонала позволило обнаружить связь реакций на туберкулин, активации инфекции у животноводов и наличие у них контактов с бациллярными больными (11).

Характерной чертой ситуации в стаде было длительное выявление коров в симультанной пробе с оценкой "+" и "=" без патоморфологического и бактериологического подтверждения туберкулеза. Это подтверждает данные о способности крупного рогатого скота противостоять развитию заболевания, но не персистенции *M.tuberculosis* (12).

В ИФА был отмечен повышенный уровень специфических антител, причем у части животных он был выше именно к *M. tuberculosis*. Однако позитивные результаты ИФА, даже с высокоочищенными антигенами *M.bovis*, могут быть связаны с инфицированием животных атипичными микобактериями (3, 5). На наш взгляд, более информативны варианты ИФА, отражающие накопление и циркуляцию в крови иммунных комплексов и микобактериальных антигенов, что наблюдается только при туберкулезной инфекции (5, 6, 7). Так, определение в ИФА показателя ДБА, отражающего способность антител пробы связывать в жидкой фазе антигены микобактерий и их концентрацию в иммунных комплексах, а также уровня ингибции активности тест-антисыворотки, коррелирующего с содержанием микобактериальных антигенов в крови, показало, что, соответственно, у 40—86,7% и 73,3% реагировавших коров они были положительными.

Тот факт, что при выраженном иммунном ответе и высокой концентрации в крови микобактериальных антигенов не удалось получить рутинного лабораторного подтверждения инфицирования коров, свидетельствует о персистенции слабопатогенных адаптивных форм возбудителя и непригодности обычных бактериологических методов для оценки состояния стада. Только с помощью посева крови на питательную среду ВКГ удалось получить прижизненное бактериологическое подтверждение инфицирования животных и результатов ИФА. Кроме того, положительные результаты в ИФА и на среде ВКГ были получены у части туберкулинотрицательных животных. Это подтверждает ограниченную чувствительность туберкулиновой пробы и необходимость расширения спектра методов для реальной оценки инфицированности стада (9).

Считается, что высокая эффективность питательной среды ВКГ связана с тем, что предварительная инкубация материала в стимуляторе роста ВКГ активирует калий-натриевый "насос" микобактериальных клеток, в том числе трансформированных, что ускоряет их рост и задерживает формирование липидной оболочки (8). Поэтому на среде ВКГ как типичные микобактерии туберкулеза, так и трансформированные через 2—4 суток дают рост неокислостойчивых полиморфных палочек, кокков и других форм, сохраняющих видовые и родовые антигены. Фактически, выделение такой культуры надо расценивать как бактериологический маркер туберку-

лезной инфекции, так как примерно одинаковые по морфологии культуры выделяются при распространенном заболевании и латентной инфекции (9).

Микобактерии, выращенные на среде ВКГ, не имеют выраженной липидной оболочки и легко суспендируются в жидкостях. Это позволяет использовать РА для их быстрой идентификации. Выделенные культуры агглютинировались бараньей антисывороткой к типичным микобактериям туберкулеза и не давали агглютинатов в нормальной сыворотке и антисыворотках к другим микроорганизмам.

Принадлежность ВКГ-изолятов к возбудителю туберкулеза млекопитающих была подтверждена в РА и ПЦР, вместе с тем определение типа культур было затруднено из-за слабой изученности свойств трансформированных *M.tuberculosis* и *M.bovis*. Это не снижает ценность результатов, так как нельзя исключить пассаж *M.tuberculosis* на крупном рогатом скоте и соответствующее изменение биохимических и патогенных свойств (12).

Несмотря на низкую патогенность ВКГ-изолятов, гистологическое исследование показало неспецифические изменения в лимфатических узлах и поражение сосудов. Высокая результативность исследования крови на среде ВКГ, значительный уровень микобактериальных антигенов, обнаружение морфологической реакции сосудов указывает на гематогенное течение инфекции. Это согласуется с данными З.С. Земсковой и Н.И. Дорожковой (13), свидетельствующими о том, что заражение L-формами возбудителя туберкулеза, как правило, сопровождается формированием лимфоидно-макрофагальных инфильтратов в стенках кровеносных сосудов.

ВЫВОДЫ

1. Причиной реакций на туберкулин у коров в благополучном по туберкулезу стаде явилась латентная туберкулезная инфекция, связанная с работой больного животновода.

2. Определение в крови с помощью ИФА уровня специфических антител, их способности связывать микобактериальные антигены в жидкой фазе, концентрации антигенов и иммунных комплексов позволяет быстро определить наличие туберкулезной инфекции в стаде.

3. Посев крови на питательную среду ВКГ дал бактериологическое подтверждение персистенции возбудителя туберкулеза и циркуляции микобактериальных антигенов в крови.

4. *M.tuberculosis* у крупного рогатого скота под воздействием факторов защиты переходит в некультивируемое состояние и условно-стабильные L-формы. Традиционные бактериологические методы и туберкулиновая проба не дают информации о состоянии стада, поэтому необходим пересмотр подходов к диагностике инфекции.

5. При латентной туберкулезной инфекции у животных отмечаются выраженные неспецифические морфологические реакции в лимфатических узлах и поражения сосудов, указывающие на гематогенное течение инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авербах М.М., Романова Р.С., Инсанов А.Б. Циркулирующие иммунные комплексы и микобактериальные антигены в крови больных туберкулезом легких // Журн. Микробиол. — 1984. — № 12. — С. 91—94.
2. Баенский А.В. Усовершенствование методов серодиагностики туберкулеза (определение антигенов микобактерий и противотуберкулезных антител). // Автореф. дис. канд. мед. наук. — М., 1993. — 20 с.
3. Власенко В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности. Винница: Наука, 1998. — 350 с.
4. Дяченко Г.М. Адаптивна мінливість мікобактерій туберкульозу в організмі не властивих хазяїнів. Автореф. дис. канд. вет. наук. — Київ, 1998. — 17 с.
5. Земскова З.С., Дорожкова Н.И. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция: М.: Медицина, 1984. — 221 с.
6. Лысенко А.П. Антигены *Mycobacterium bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота // Автореф. дис. докт. вет. наук. — Минск, 1994. — 35 с.
7. Лысенко А.П., Агеева Т.Н., Красникова Е.Л., Суркова Л.К., Яковлева Л.Ф., Притыченко А.Н. Изучение взаимосвязи инфицирования возбудителем туберкулеза человека и крупного рогатого скота с применением ИФА и питательной среды ВКГ / Актуальные проблемы фтизиатрии и пульмонологии. Сборник научных трудов к 75-летию НИИ пульмонологии и фтизиатрии. — Минск, 2003. — С. 90—94.
8. Лысенко А.П., Агеева Т.Н., Карпова Г.А. Уровень антител к антигенам *M. bovis* и *M. tuberculosis* в сыворотках крови коров с реакциями на туберкулин / Сборник научн. трудов VI съезда фтизиатров РБ. — Минск, 1998. — С. 191—195.
9. Лысенко А.П., Лемши А.П., Красникова Е.Л., Архипов И.Н., Степаненко О.Н., Рафалович В.В., Притыченко А.Н., Яковлева Л.Ф. Диагностическая ценность питательной среды ВКГ для прижизненного выявления туберкулезной инфекции крупного рогатого скота // Ветеринарная медицина — Миссвид-темат. наук. зб. 85. — 2005. — С. 236—240.
10. Шаров А.Н. Аллергическая диагностика туберкулеза у животных: повышение ее эффективности // Автореф. дис. докт. вет. наук. — М., 1989. — 29 с.
11. Шаров А.Н., Ерошенко Л.А., Суханов И.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Грабовецкий В.В. Эффективность методов прижизненной диагностики туберкулеза. Ветеринария, №2, 2000. — С. 7—9.
12. Adams L.G. In vivo and in vitro of *Mycobacterium bovis* infection Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 2001 (1), p. 304—324.
13. Hastings E., Beach B., Weber C. Nolesion and skinlesion tuberculin-reacting cattle // J. Am. Vet. M. A. — 1924. — 66. — P. 36—42.



ПГ-600®

Эффективный и безопасный препарат для стимуляции охоты и синхронизации овуляции у половозрелых свиноматок

— ПГ-600® содержит комбинацию двух наиболее важных гормонов, необходимых для стимуляции развития фолликулов (сывороточный гонадотропин (СЖК) — 400 МЕ), овуляции и образования желтого тела (хорионический гонадотропин (hCG) — 200 МЕ).

— При применении ПГ-600® побочные действия отсутствуют из-за низких концентраций действующих веществ препарата и высочайшей очистки используемых гормонов.

— В отличие от СЖК, при применении которого часто наблюдают кистозное поражение яичника с последующей выбраковкой свиней, ПГ-600® — самый безопасный препарат в своем классе.

— Использование ПГ-600® позволяет добиться значительного сокращения (на 5—10 дней) времени непродуктивного использования свиней, что уже окупает его применение, с последующим улучшением основных показателей воспроизводства, повышением многоплодия вследствие стимуляции “компактной” овуляции. А также проводить лечение и профилактику гипофункции яичников и послеродового анэструса у свиней.

Применяется для:

1. Стимуляции охоты и профилактики гипофункции яичников у ремонтных свинок.
2. Стимуляции охоты, лечения гипофункции яичников и профилактики послеродового анэструса у свиноматок после первого опороса.
3. Стимуляции охоты у свиноматок старшего возраста.

ПГ-600® — самый эффективный и безопасный!