

УДК 619:615.371:616.98:579.873.21
© 2001

В.А.Бусол,

академик УААН

Л.С. Короленко, И.А.

Бибен, А.М. Коваленко,

кандидаты ветеринарных наук

АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*Досліджуються існуючі високочутливі методи діагностики туберкульозу великої рогатої худоби, засновані на тестуванні суцільної крові, сироватки з використанням експрес-діагностиків *M. bovis* і застосуванні ПЦР. Встановлено, що ці засоби дозволяють підвищити ефективність діагностичних заходів; вакцинопрофілактика тварин з допомогою БЦЖ ефективно захищає їх від туберкульозної інфекції. Запропоновані тести, що дозволяють віддиференціювати вакцинованих тварин від заражених збудником туберкульозу.*

Туберкулез (*M.bovis*) – это скрыто протекающее хроническое заболевание крупного рогатого скота, многих других видов животных и человека.

Оздоровление крупного рогатого скота от туберкулезной инфекции осуществляется выделением из стад реагирующих на туберкулин животных с последующим убоем их на санитарных бойнях и проведением всего комплекса ветеринарно-санитарных мероприятий. Однако это требует больших финансовых затрат, времени и заинтересованности контролирующих и исполнительных структур. Если процесс оздоровления животных затягивается, то возможно перезаражение возбудителем *M.bovis* животных и человека. Препятствуют оздоровлению значительных территорий от этой инфекции неполное удаление с территории ферм возбудителя туберкулеза, наличие природного резервуара возбудителя инфекции (диких животных).

Согласно данным МЭБ, из 84 стран, участвующих в опросе, 32 % стран подтвердили, что эта болезнь у них никогда не регистрировалась или была ликвидирована, 33 % имеют обязательную национальную программу борьбы с туберкулезом, 16 % сочетают обязательные и добровольные профилактические мероприятия, а 19 % стран не ведут вообще программ.

Крупный рогатый скот заражается в основном респираторным путем, а иногда оральным, например, при поедании корма с пастбищ, контаминированных *M.bovis* инфекцией. Проникать инфекция при назальном или оральном заражении может через миндалевидные железы.

В большинстве развитых стран, благодаря эффективным программам борьбы, вспышки туберкулезной инфекции стали редкими, а случаи заражения крупного рогатого скота друг от друга не столь многочисленными; инфицированные животные удаляются еще перед тем, как стать контагиозными.

При инфицировании животного *M.bovis* скорость распространения инфекции зависит от ряда факторов: генотипа, иммунного статуса животного и внешних стресс-факторов. При угрозе поражения организма инфекцией *M.bovis* срабатывают два иммунологических Т-клеточных механизма: Th1 и Th2. Если преобладает иммунный ответ Th1, действуют иммунные защитные реакции и макроорганизм может победить *M.bovis*. Если же преобладающим является Th2 иммунный ответ, то инфекция начинает развиваться с прогрессированием туберкулезных поражений.

Эффективной считается вакцина, которая стимулирует защитный иммунный ответ. Упомянутые иммунные ответы послужили основой для новых диагностических тестов *in vitro*.

У крупного рогатого скота кожный туберкулиновый тест дает возможность выявить до 90 % инфицированных животных. Неспецифические реакции на туберкулин и недостаточная чувствительность кожного теста явились причиной разработки нескольких тестов с кровью *in vitro*. Все эти тесты основаны на измерении уровня популяций Т-лимфоцитов, а не уровня антител.

Тест с гамма-интерфероном (IFN- γ).

Когда лимфоциты подвергаются антигенной атаке со стороны возбудителя туберкулеза или продуктов его жизнедеятельности, освобождается цитокин IFN- γ . На этой основе построена методика реакции ELISA. У крупного рогатого скота тест с IFN- γ имеет высокую чувствительность (88–96,6 %) и специфичность (96,2–98 %). Доказано, что тест с IFN- γ позволяет выявить инфицированных животных на более ранней стадии, нежели аллергическая диагностическая проба, и его можно применять через 7 дней после АДП. Тест с IFN- γ признан в качестве основного диагностического теста в Австралии.

В перспективе большое количество специфических *M. bovis* антигенов может заменить ППД туберкулин, повысив одновременно специфичность и чувствительность тестов АДП и IFN- γ .

Тест пролиферации лимфоцитов (LPA) служит иммунологическим диагностическим тестом, используемым для выявления инфицированных возбудителей туберкулеза животных, посредством определения пролиферирующих лимфоцитов *in vitro*. Для выявления инфицированных животных был разработан тест с кровью, объединяющий LPA и серологический метод ELISA. Ассоциация клеточного теста и теста для выявления антигенов придает методике с кровью достаточно широкий диагностический спектр. Этот комплексный тест обладает 95 %-ной чувствительностью и 98 %-ной специфичностью и разрешен в качестве серийного в США и Новой Зеландии. Считается, что изотип антител, выявленный в тесте ELISA, оказывает влияние на чувствительность метода. Соотношение ответов Ig G1 к определенному антигену (rMPB70) до и после туберкулинового теста позволяет выделять среди животных особи с патолого-анатомическими поражениями туберкулезного характера.

Цепная полимеразная амплификация. Использование PCR – альтернатива культуральному методу исследования выделений *M. bovis* из тканей животных. PCR обладает 90 %-ной чувствительностью в сравнении с культуральным способом и позволяет обнаруживать даже ничтожно малые количества *M. bovis* на ранних стадиях заражения, когда не чувствителен ни один из существующих тестов. Техническая сложность постановки PCR не позволяет повсеместно в настоящее время использовать его вместо бактериологического метода.

Из сообщения об экспериментах по вакцинации, проведенных в 50-е годы, следует, что БЦЖ (бацилла Билье де Калметте и Герена) не создает защиты у крупного рогатого скота. Поэтому в 1959 году ВОЗ рекомендовала прекратить вакцинацию крупного рогатого скота. Вспышки туберкулеза у людей и проблемы, возникающие при борьбе с туберкулезом у животных, сделали вакцинацию против туберкулеза важным направлением в научных исследованиях.

К числу главных факторов, оказывающих влияние на эффективность вакцинации БЦЖ, отнесены: доза, штамм и живучесть микроорганизмов БЦЖ, презентабельность антигенов, генотип хозяина, стресс-факторы окружающей среды и предшествующее поражение какими-либо другими микобактериями.

Для получения стойкого иммунитета против туберкулеза главное, чтобы вакцина активизировала надлежащий тип иммунного ответа (Th1).

К альтернативным направлениям научного поиска относятся: аттенуация *M. bovis*, идентификация иммуногенных антигенов для использования их в рекомбинантных вакцинах, изучение ДНК и субъединичных вакцин.

С точки зрения конструирования новых противотуберкулезных субъединичных вакцин наиболее перспективными представляются секретируемые белки микобактерий (так называемые белки культурального фильтрата) [1].

Учеными из Дании во главе с П. Андерсеном выделено семейство белков раннего культурального фильтрата *M. tuberculosis* (ESAT-6, TB10.4, TB9), обладающих существенной протективной активностью в экспериментальных моделях [3]. Авторами предложена довольно удачная комбинация бромида диоктадециламмония (DDA) и монофосфориллипида А (MPL). Изучение иммуногенности двух препаратов, состоящих из белков культурального фильтрата *M. tuberculosis*, на приматах продемонстрировало безопасность и эффективность использования адьюванта RIBI [2].

Зачастую комбинация белков или отдельных эпитопов, объединенных в единую молекулу, способна генерировать более эффективную протекцию, чем отдельные составляющие. В. В. Еремееву и соавт. удалось продемонстрировать, что смесь ESAT-6 и MPT59 (антиген 85B) либо гибридный белок, состоящий из двух молекул,

1. Результаты аллергических исследований крупного рогатого скота

Группа животных	Реагировало на ППД-туберкулин, %						
	до начала опыта	после иммунизации, мес.					
		1	1,5	3	3,5	7	8
1. Опытная «ПКП-3»	–	100	51	29 ^{*28}	7 ^{*28}	4 ^{*24}	–
2. Опытная «БЦЖ»	–	100	100	–	14	–	–
3. Контроль	–	–	55	–	–	–	–
4. Больные животные	100	100	100	–	–	–	–

^{*n} – количество реагировавших на туберкулин животных приведено по отношению к фактическому количеству животных в группе (n).

в сочетании с комбинированным адьювантом MPL/DDA способны защитить мышей от туберкулеза не хуже БЦЖ.

Разработанный и апробированный нами на высоковосприимчивой лабораторной модели (морских свинок) противотуберкулезный молекулярно-субъединичный комплексный препарат ПКП-3 был подвергнут испытаниям по изучению его иммуногенных и протективных свойств на крупном рогатом скоте в условиях неблагополучного по туберкулезной инфекции хозяйства. Для проведения опытов исследовали животных ЗАО «Єдність» Магдалиновского района Днепропетровской области, неблагополучного по туберкулезу крупного рогатого скота с 1996 г.

За 1996 г. выделено 17 коров, реагирующих на туберкулин из 926 голов (450 коров) общего поголовья крупного рогатого скота, а при диагностическом убое реагирующих – у 2 коров выявлены туберкулезные поражения лимфатических узлов (средостенных, бронхиальных). На следующий год выявлено уже 265 (117 коров), из них у шести – выявлены патолого-анатомические изменения, присущие туберкулезной инфекции.

В 1998 г. было выявлено 110 голов (91 корова) при общем поголовье животных в хозяйстве 568 голов (300 коров). При убое реагирующих у 8 из них обнаружены поражения туберкулезного характера. Поголовье животных в 1999 г. уменьшилось до 292 голов (156 коров). Аллергическими исследованиями всего поголовья выделено 39 голов (28 коров) крупного рогатого скота, среди которых при диагностическом убое у 18 голов выявлены туберкулезные поражения.

Во время весенней туберкулинизации 2000 г. из всего поголовья животных (200 голов) выявлено 12 реагирующих на туберкулин животных, а при их убое – у 9 выявлены классические поражения туберкулезного характера легочных лимфоцитов.

В опыт брали все поголовье крупного рогатого скота, насчитывающее 113 голов, из которых 76 коров, 22 – телки до 6-месячного возраста, 14 – бычков до 2-х лет и 1 бык-производитель. Животные были разбиты на 4 группы. В три из них отобрали животных, до начала опыта не реагировавших на туберкулин: 2 опытные (68 и 14 голов) и 1 контрольную (17 голов). Животным этих групп вводили:

1-й группе ($n = 68$) – препарат ПКП-3 в дозе компонент № 1 – 5,0 см³ и компонент № 2 – 1,0 см³ подкожно, ниже средней линии шеи с левой и правой стороны, двукратно с интервалом 14 суток;

2-й группе ($n = 14$) – вакцину БЦЖ Ставропольской биологической фабрики в дозе 1,0 см³ подкожно, ниже средней линии шеи, двукратно с интервалом 14 суток;

3-й группе (контрольная $n = 17$) – стерильный физиологический раствор подкожно в дозе 5,0 см³.

В 4-ю группу вошли животные (14 голов), которые до начала опыта реагировали на ППД-туберкулин (больные). Животным этой группы ничего не вводили.

После иммунизации животные всех групп были размещены в одном помещении при беспривязном содержании.

Для проведения бактериологических исследований, установления выделяемости микобактерий туберкулеза, из экскретов больных животных двукратно отбира-

2. Динамика изменения иммунного статуса крупного рогатого скота под действием препарата ПКП-3

Срок проведения исследования	Количество лимфоидных клеток в периферической крови, тыс./мл		
	Т-хелперы	Т-супрессоры	В-клетки
До введения ПКП-3	2,7±0,1	0,4±0,01	1,1±0,001
Через 1,5 мес.	4,3±0,1	0,35±0,01	2,8±0,3
Через 4 мес.	4,2±0,1	0,3±0,01	2,9±0,1
Через 8 мес.	4,1±0,1	0,4±0,01	2,5±0,1
Через 10 мес.	4,1±0,1	0,4±0,01	2,1±0,1

ли пробы молока, бронхиальной слизи и крови.

Пробы крови отбирали от животных всех групп до начала опыта и через 1; 1,5; 3; 4; 8 и 10 месяцев после иммунизации для гематологических и биохимических исследований.

Аллергические исследования проводили до начала опыта и через 1; 1,5; 3; 3,5; 7 и 8 месяцев после иммунизации с использованием ППД-туберкулина для млекопитающих, с последующим диагностическим убоем реагирующего скота из опытных и контрольных групп через 2 (24 головы), 3 (30 голов), 6 и 8 (49 голов), 12 (3 головы) месяцев и проведением патолого-анатомических и бактериологических исследований.

При проведении аллергических исследований установлено, что через месяц после иммунизации в обеих опытных группах реагировали все животные (табл. 1).

В результате проведенных исследований из образцов бронхиальной слизи, кро-

ви и молока при посеве на среду Левенштейна-Иенсена не получено культуры микобактерий туберкулеза, а при постановке биологической пробы с этими образцами погибли от туберкулеза через 3 месяца после заражения молоком, полученным от 11 (91 %) из 12 больных животных. При введении молока, крови и бронхиальной слизи от нереагирующих животных (условно здоровых) морским свинкам случаев гибели животных и поражений туберкулезного характера при вскрытии не обнаружено.

Выявление аллергических реакций у иммунизированных животных в течение 7 месяцев свидетельствует о существовании антигенной атаки на макроорганизм со стороны возбудителя туберкулеза (больных животных), а дальнейшее исчезновение реакций указывает на элиминацию возбудителя вследствие высокой напряженности выработанного противотуберкулезного иммунитета.

3. Результаты патолого-анатомических и бактериологических исследований

Группа животных	Патолого-анатомические изменения туберкулезного характера	Бактериологические исследования *
1. Опытная «ПКП-3»	2 головы – увеличение средостенных и бронхиальных лимфатических узлов	–
2. Опытная «БЦЖ»	2 головы – туберкулезные поражения лимфатических узлов, 3 головы – значительное увеличение и поражение заглочных и бронхиальных лимфатических узлов	+ 5
3. Контроль	13 голов – поражение заглочных и средостенных лимфатических узлов с казеозным содержимым	+ 15
4. Больные животные	1 голова – жемчужница; 8 голов – диффузное поражение заглочных, бронхиальных, средостенных лимфатических узлов и плевры	+ 14

* Количество голов с выделенным возбудителем туберкулеза.

Через 5 месяцев положительных аллергических реакций в опытных группах не наблюдали. В контрольной и группе больных туберкулезом через 3 месяца после начала опыта исчезали реакции на туберкулин, что, по всей видимости, связано с тяжестью развития инфекционного процесса и патолого-анатомическими изменениями, повлекшими за собой состояние анергии у больного крупного рогатого скота.

При проведении гематологических исследований крови больных (5 голов) и контрольных (5 голов) животных через 3 месяца после начала опыта наиболее выраженные изменения установлены в эритропоэтической системе. У больных и контрольных животных наблюдалось достоверное снижение количества эритроцитов (на 22 %) и повышение уровня гемоглобина (на 20 %). Это обусловило повышение среднего количества гемоглобина в эритроците до $14,5 \pm 0,25$ пг, что превышает контрольные показатели у здоровых животных до начала опыта на 55 %.

Определяемые нами показатели общего белка, циркулирующих иммунных комплексов, серомукоидов, диеновых конъюгатов, малонового диальдегида в плазме крови больных и контрольных животных не отличались существенно от таковых у здоровых животных.

Наблюдался существенный ответ Т-клеточной системы иммунитета на введенные антигены, проявляющееся увеличением популяции Т-хелперов (Th) и значительным уменьшением Т-супрессорных клеток. Тенденция увеличения количества В-лимфоцитов более чем в 2 раза была достоверной по сравнению с показателями до введения препарата (табл. 2).

Необходимо отметить, что рост популяции Т-хелперов продолжался до 8 мес., затем снижался, а увеличение популяции В-клеток длилось до 5 мес. с постепенным снижением этого показателя (10-месячный срок наблюдения).

Эти данные по реактивности и скорости ответа Т- и В-систем иммунитета на введение препарата указывают на доста-

точно интенсивную иммунную Т-клеточную реакцию и быструю наработку антител, что подтверждено данными серологических исследований в РИД с данными антигенами.

В результате проведенных патолого-анатомических исследований установлено, что у двух животных, иммунизированных изучаемым препаратом, обнаружены увеличение средостенных и бронхиальных лимфатических узлов без видимых туберкулезных поражений с проявлением кровоизлияний и саловидности на разрезах.

Характерные туберкулезные изменения в лимфатических узлах обнаружены у двух животных и значительное увеличение заглочных и бронхиальных лимфатических узлов у трех бычков, вакцинированных БЦЖ.

Интенсивные поражения внутренней стенки грудной полости в виде жемчужницы обнаружены у коровы, а также значительные поражения заглочных и средостенных лимфатических узлов обнаружены у 8 больных туберкулезом и 13 контрольных коров.

Все пораженные и непораженные лимфатические узлы были отобраны для проведения бактериологических исследований и постановки биологической пробы. В результате выделен возбудитель туберкулеза бычьего вида из патолого-анатомического материала от животных 2-й, 3-й и 4-й групп (табл.3).

Полученные данные дают основание сделать соответствующие выводы:

- двукратное с интервалом в 14 сут. введение препарата ПКП-3 в предлагаемых дозах крупному рогатому скоту обеспечивает надежную защиту до 90 % восприимчивых животных от спонтанного заражения возбудителем туберкулеза бычьего вида.
- постоянное инфицирование иммунизированных животных возбудителями туберкулеза от больных коров лишь индуцирует временное (1-2 месяца) состояние ГЧЗТ на туберкулин. При этом развития туберкулезного процесса у иммунизированных животных не наблюдалось.

Библиография

1. Еремеев В.В. Новая противотуберкулезная вакцина: мечта или реальность // Проблемы туберкулеза. – 2001. – №1. – С. 53–55.
2. Attanasio R., Pehler K., Mcolure H.M. Clin.exp.Immunol. – 2000. – Vol.119. – P. 84–91.

3. Brandt L.K., Elhay M., Rosenkrands I. et al. Infect.and Immun. – 2000. – Vol.68. – P. 791–795.
4. Skjot R.L. et al. Comparative evaluation of low mass T-cell antigens from Mycobacterium tuberculosis identify ESAT-6 family members as immunodominant // Infect.Immun. – 2000. – 68. – P. 214–220.