

ERADICATION OF BOVINE LEUCOSIS AS SIGNIFICANT ELEMENT OF BIOSAFETY

Gorbatenko S.K.

NSC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

Information about problems in registration of incidents of detection of animals infected by a virus of leucosis among livestock population of adjoining the farm and small farms, inconformity of accounting of region managements and state laboratories of veterinary medicine that negative influence on planning of antiepidemiologic measures, successful ending of the problem of final liquidation of bovine leucosis in livestock farming of Ukraine are presented in the article.

УДК 619:616.98:579.873.21:616-076

ПАРАТУБЕРКУЛЕЗ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Завгородний А.И., Позмогова С.А.

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

Головко В. А.

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Паратуберкулез (болезнь Йоне) – это хронический гранулематозный энтерит жвачных животных, характеризующийся расстройством желудочно-кишечного тракта, прогрессирующим истощением и летальным исходом. Болезнь чаще всего выявляют у домашних и диких жвачных животных. Описаны случаи выделения возбудителя паратуберкулеза у лошади, свиньи, оленей и альпака, а совсем недавно, у кроликов, горностаев, лисиц, ласок и бурых медведей. У домашних жвачных паратуберкулез, главным образом, регистрируют в молочных стадах КРС, также у овец и коз [1, 2, 3, 4].

В 1895 г. в Германии Johnе и Frothingham впервые обнаружили и описали возбудителя болезни в мазках из подвздошной кишки больной коровы. Они предположили, что заболевание вызвано кислотоустойчивой бактерией и представляет нетипичную форму туберкулеза. В 1910 году Twort изолировал возбудителя болезни и назвал его *Mycobacterium enteriditis chronicae Bovis*, который позднее классифицировали как *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (M. paratuberculosis)* [19]. Возбудитель паратуберкулеза относится к комплексу *Mycobacterium avium-intracellulare*. Данная классификация основана на ДНК-гибридизации таксономических исследований и численного анализа. Фенотипически возбудитель паратуберкулеза отличается от остальных подвидов *M. avium* микобактин-зависимостью.

Выделяют два основных типа возбудителя: I тип или S штамм (пигментированный) и II тип или C штамм. I тип выделяют в основном у овец, II тип возбудителя имеет широкий диапазон хозяев: КРС, козы, семейство верблюдовых [5]. Возбудитель паратуберкулеза – самая мелкая из микобактерий кислото-стиртоустойчивая палочка длиной 0,5-1,5, шириной 0,2-0,5 мкм, неподвижная, спор и капсул не образует. В мазках, окрашенных по методу Циля-Нильсена, ярко-красные микобактерии расположены кучками, гнездами, редко одиночно. Культивируется возбудитель на специальных питательных средах с содержанием фактора-роста (микобактина), растет очень медленно, первичный рост колоний обычно появляется через 8 – 12 недель после посева. В последние десятилетия установлено, что *M. paratuberculosis* (и некоторые другие микобактерии) могут существовать с так называемой «дефектной клеточной стенкой» или в сферопластовой форме. Поскольку клеточная стенка определяет кислотоустойчивость, то бактерии в сферопластовой форме не могут быть обнаружены с помощью световой микроскопии, что затрудняет бактериоскопию. Однако *M. paratuberculosis* при благоприятных условиях могут реформировать свою клеточную стенку даже спустя годы, и реверсировать в бактериальную форму [7, 8].

Важной вехой в исследовании паратуберкулеза стало открытие в 1987 году генетического кода. Была идентифицирована последовательность вставки IS900, которая является специфичной для *M. paratuberculosis* [6, 15].

Возбудитель паратуберкулеза обладает значительной устойчивостью к воздействию факторов внешней среды и различным дезинфицирующим средствам. Так бактерии выживают в воде в течение 9 месяцев, около года – в коровьем навозе, 47 мес. – в почве, выдерживают замораживание до 14 °С – 1 год. Возбудитель погибает в течение 10 минут после контакта с формалином (5 %), фенолом (разведенный 1:40), гипохлоритом натрия (разведенный 1:50) [10].

По данным ООН, болезнь Johnе признана одной из самых серьезных болезней современности, поражающих сельскохозяйственный скот со значительными экономическими последствиями. Так, в Европе экономический ущерб из-за снижения производства продукции животноводства, выбраковки, истощения, бесплодия и гибели инфицированных животных составляет от 200 до 250 млн долларов в год. Опубликованные в 2007 г. данные серологического исследования проведенного методом ИФА (ELISA) показали, что процент инфицированного скота в Англии составляет – 17,4 %; в Бельгии – 6 %; в Словении – 11,6 %; в Дании – 70 %; в Бразилии 37,9 %; в Нидерландах 2,7-6,9 % мясного и 31-71 % молочного стада; в Аргентине – 26,5 % и 56 % соответственно. По данным министерства сельского хозяйства США 20-40 % молочного и 8 % мясного скота поражены болезнью Johnе. При этом распространение заболевания, в зависимости от изучаемого региона, варьирует от 1,6 % до 18 % случаев, в результате чего экономический ущерб составляет, по меньшей мере, 1,5 млрд долл в год. Аналогичные данные описаны в Японии, Австралии, Новой Зеландии. В Греции серологическими, бактериологическими и патологоанатомическими методами было выявлено 46,7 % инфицированных овец [11, 12, 13].

Заражение жвачных животных возбудителем *M. paratuberculosis*, как правило, происходит в молодом возрасте через молоко, молозиво, а также воду, инфицированную выделениями больных животных. В литературе имеются сообщения о внутриутробном пути передачи возбудителя и через сперму [14].

Различают две стадии болезни: латентную и клиническую. Диагноз на паратуберкулез в клинической стадии ставят на основании клинических признаков и подтверждают наличием *M. paratuberculosis* в фекалиях с помощью световой микроскопии или с использованием ДНК-зондов и ПЦР, а также при обнаружении характерных для данной болезни поражений в кишечнике, и выделении культуры [18].

Субклиническую стадию диагностируют серологическим (на основании обнаружения специфических антител), аллергическим и бактериологическим (выделение *M. paratuberculosis* из фекалий или тканей) методами. При этом обычно используют реакции имеющие отношение к гуморальному иммунитету: реакцию связывания комплемента (РСК), абсорбционный иммуноферментный анализ (ЭЛИСА) и реакцию иммунодиффузии в геле; реакции имеющие отношение к клеточному иммунитету: анализ гамма-интерферона, а также определение ГЧЗТ (туберкулиновая проба)[18].

Диагностические тесты, основанные на конкретной последовательности ДНК, позволяют быстро и безопасно идентифицировать медленно растущие бактерии, определять возбудителя в фекалиях, молоке и тканях. Однако генетическая последовательность вставки IS900, которая считалась специфичной для *M. paratuberculosis*, была обнаружена и в изолированных от здоровых коров *M. cookie* [11, 15].

Болезнь Johnе является одной из самых сложно контролируемых и диагностируемых инфекций. Это отчасти связано с циркуляцией возбудителя в популяциях диких животных. Но главная трудность выявления возбудителя и контроля болезни в том, что инкубационный период, может длиться от 6 месяцев до 15 лет. При этом инфицированные животные не имеют типичных клинических признаков болезни Johnе, но они являются носителями бактерий и периодически выделяют возбудитель в окружающую среду, что представляет угрозу заражения восприимчивых животных и способствует распространению инфекции в стаде. Таким образом, проблему болезни Johnе можно сравнить с вершущей айсберга – так называемый «Айсберг эффект», на один клинический случай приходится пятнадцать или двадцать инфицированных животных в латентной форме. В «скрытости» этой инфекции, а также из-за низкой специфичности и чувствительности имеющихся диагностических тестов и кроется причина, по которой болезнь Johnе's распространилась в мире до такой степени [7, 8, 9].

В последние десятилетия остро ведутся научные дискуссии о причастности возбудителя паратуберкулеза животных в возникновении болезни Крона у человека. Европейская комиссия здравоохранения и Научный комитет по охране здоровья животных в 2000 г. рассматривали доказательства «за» и «против» причинной связи между двумя этими заболеваниями, но единогласного мнения по этому вопросу не было высказано, однако и не было исключено предположение, что патогеном у животных и человека является *M. paratuberculosis*. Проходивший в США в 2009 г. 10-й Международный симпозиум по паратуберкулезу также не дал конкретный ответ на этот вопрос. При болезни Крона, как и при паратуберкулезе животных, у человека поражается желудочно-кишечный тракт, специальное лечение отсутствует. Болезнь характеризуется периодическими эпизодами рецидивов, ремиссий и требует нескольких хирургических вмешательств на протяжении всей жизни. Болезнь Крона широко распространена в Европе, Америке и Австралии и, как правило, в зоне риска находится возрастная группа 15-25 лет. На общее ежегодное медицинское обслуживание больных в США в среднем тратится 1,0 – 1,5 млрд долларов. Люди подвергаются заражению, употребляя в пищу молоко инфицированных коров. В Ирландии, которая имеет самое высокое потребление молока на душу населения в Европейском Союзе, при исследовании пастеризованного молока из 16 розничных торговых точек получили результат, посеявший панику среди потребителей: из 31 коробки молока в 6 случаях выделили *M. paratuberculosis*, это 19 % – почти 1 к 5. В ответ на давление общественности, британское правительство инициировало выборочное исследование розничного пастеризованного молока. Результаты обследования, проведенного британским правительством, были опубликованы в апреле 2010 года: три процента из каждых ста коробок с молоком – инфицированы живыми *M. paratuberculosis* [16, 17].

В результате широкого распространения инфекции, а также беспечности, вызванного возможной причастностью *M. paratuberculosis* в возникновении болезни Крона у человека, в некоторых странах, включая Австралию, Норвегию, Исландию, Японию, Нидерланды и Соединенные Штаты созданы национальные программы по контролю, искоренению и профилактике паратуберкулеза.

Как видно из приведенных данных эпизоотическая ситуация по паратуберкулезу в мире крайне напряжена. Поголовье КРС в Украине на сегодняшнее время считается благополучным по этому заболеванию. Однако не исключен тот факт, что при комплектовании отечественных стад завезенными из-за границы высокопродуктивными животными, закупкой спермы элитных быков-производителей возможен занос возбудителя паратуберкулеза и на территорию Украины. Кроме того, диагностические исследования на наличие паратуберкулеза в стране и у закупаемого скота в настоящее время не проводятся.

Ветеринарная медицина Украины должна признать и принять тот факт, что необходима разработка эффективных программ контроля эпизоотической ситуации по паратуберкулезу в Украине, а также проведения диагностического исследования животных, ввозимых из-за рубежа. Поэтому усилия научных специалистов должны быть направлены на разработку простых, быстрых и безопасных диагностических тестов, и которые могли бы быть выполнены ветеринарными врачами без применения дорогого лабораторного оборудования. Крайне важно разрабатывать эффективные методы предпосевной обработки биологического материала, индикации и идентификации *M. paratuberculosis*. До настоящего времени культуральный метод в постановке диагноза на паратуберкулез является «золотым стандартом». Однако все стандартизованные питательные среды для выделения и культивирования *M. paratuberculosis*, а также фактор роста (*mycobactin j*), импортного производства, биологическая промышленность Украины не производит ни питательные среды, ни микобактин, а без выделения чистой культуры возбудителя *M. paratuberculosis* невозможна дальнейшая работа по получению новых диагностикомов.

Учитывая актуальность проблемы в отделе изучения туберкулеза ННЦ «ИЭКВМ» начаты работы по разработке питательных сред для культивирования *M. paratuberculosis*. Так разработана и подана заявка на декларационный патент на питательную среду для культивирования возбудителя паратуберкулеза, в состав которой входят отечественные ингредиенты, адаптирован референтный штамм к картофельной среде. Были получены предварительные положительные результаты по разработке среды для выделения *M. paratuberculosis* из патологического материала, ведутся работы по усовершенствованию метода предпосевной обработки биологического материала и объектов внешней среды, начата работа по проведению эпизоотического мониторинга по прогнозированию и контролю паратуберкулеза в Украине.

Список литературы

1. Corn, J.L. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises [Text]// J.L. Corn, E.J. Manning, S. Sreevatsan, J.R. Fischer// Appl Environ Microbiol. – 2005. – № 71. – P. 6963-6967.
2. Crawford, G.C. *Mycobacterium avium* sub-species *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* infections in a tule elk (*Cervus elaphus nan-nodes*) herd [Text]// GC Crawford, MH Ziccardi, BJ Gonzales, LM Woods, JK Fischer, EJ Manning, JA. Mazet// J. Wildl Dis. – 2006. – № 42. – P. 715-723.
3. Коpecна, М. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in two brown bears in the central European Carpathians [Text]// М. Коpecна, S. Ondrus, I. Literak, J. Klimes, A. Horvathova, M. Moravkova, M. Bartos, I. Trcka, I. Pavlik// J Wildl Dis. – 2006. - № 42. – P. 691-695.
4. Palmer, MV. Isolation

of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle [Text]/ M.V. Palmer, W.C. Stoffregen, J.G. Carpenter, J.R. Stabel// J Wildl Dis. – 2005. - № 41. – P. 629-635. 5. Dohmann, K. Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates [Text]/ K. Dohmann, B. Strommenger, K. Stevenson, L. de Juan, J. Stratmann, V. Kapur, T.J. Bull, G.F. Gerlach// J. Clin Microbiol. – 2003. - № 41. – P. 5215-5223. 6. Mcfadden, J.J. Crohns disease – isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species [Text]/ J.J. Mcfadden, P.D. Butcher, R. Chiodini// J. Clin. Microbiol. - 1987. - № 25. – P. 796-801. 7. Thompson, D.E. The Role of Mycobacteria in Crohn's Disease. [Text]/ D.E. Thompson// J. Med. Microbiol. 1994. № 41. – P. 74-94. 8. Chiodini, R.J. Historical Overview and Current Approaches in Determining a Mycobacterial Etiology of Crohn's Disease. Is Crohn's Disease a Mycobacterial Disease? C.J.J. Mulder and G.N.J. Tytgat (Ed.) Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1992. 9. Hermon-Taylor, J. The Causation of Crohn's Disease and Treatment with Antimicrobial Drugs [Text]/ J. Hermon-Taylor// Ital. J. Gastroenterology-Hepatology. - 1998 Dec. - № 30(6). – P. 607-10. 10. Whittington, R.J. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment [Text]/ R.J. Whittington, D.J. Marshall, P.J. Nicholls, I.B. Marsh, L.A. Reddacliff// Appl Environ Microbiol. – 2004. № 70. – P. 2989-3004. 11. Lilenbaum, W. Paratuberculose [Text]/ W. Lilenbaum, C.D. Marassi// Brasil J. Microbiol. 2007. Vol.38. N4. – P. 10-12. 12. USDA: APHIS. Johne's Disease on US Dairy Operations [Text]/ National Animal Health Monitoring System. - October, 1997. 13. Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Possible links between Crohn's Disease and Paratuberculosis [Text]/ SANCO/B3/R16/2000 European Commission Directorate-General Health & Consumer Protection Directorate B - Scientific Health Opinions Unit B3. - March 2000. – № 49. 14. Coussens, P.M. Модель иммунных ответов на *M. paratuberculosis* KPC [Text]/ P.M. Coussens// Infect. Immun. – 2004. - № 72. – P. 3089-3096). 15. Englung, S. Как найти последовательности IS900 *M. paratuberculosis* помимо подвидов микобактерий. Паратуберкулез. [Текст] S. Englung, Bolske, G. Johnason // FEMS Microbiol. Lett. – 2002. - № 209. – P. 267-271. 16. Chiodini, R.J. M paratuberculosis in Foods and the Public Health Implications Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis [Text]/ R.J. Chiodini, R.K. Chiodini, M.E. Hines, M.T. Collins (Eds.)// Madison, WI: International Association for Paratuberculosis. – 1996. № 353. – P. 365. 17. Grant. IR. Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72 degrees C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk [Text]/ I.R. Grant, H.J. Ball, M.T. Rowe// Letters in Applied Microbiology. 28(6):461-5, 1999 Jun. 18. May 10, 1998 issue per (Business Wire. "Anti-Milk Group Exposes Claim That Normal Pasteurization Kills Dangerous Bacterium in Milk." July 14, 1998.). 18. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines [Text]/ OIE 2008. – Chapter 2.1.11. – P. 276. 19. Twort, F.W. Ingram GLY: A method for isolating and cultivating *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis of bovines [Text]/ F.W. Twort // Proc R Soc Lond Ser B 1912. N 84. – P. 517-542.20.

PARATUBERCULOSIS OF AGRICULTURAL ANIMALS

Zavgorodnyy A.I., Pozmogova S.A.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

Golovko V.A.

Kharkiv State Zooveterinary Academy

Data about distribution, biology of the agent of paratuberculosis, diagnostics methods are presented in the article.

УДК 616.606.446.638.2

ВПЛИВ ВАКЦИНИ «ЛЕЙКОЗАВ» НА ЕЛІМІНАЦІЮ ВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ В ЩЕПЛЕНИХ РІД-ПОЗИТИВНИХ КОРІВ

Завірюха Г.А., Завірюха А.І.

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

Ензоотичний лейкоз великої рогатої худоби є одним із проявів злоякісної пухлинної хвороби (рак) у тварин. Це одне з найнебезпечніших захворювань кровотворних органів з хронічним перебігом. Збудником хвороби є РНК-вмісний вірус типу С родини Retroviridae роду Deltaretrovirus [1, 2].

Вірус вражає кровотворну систему тварини, спричиняє патологічну проліферацію лімфоїдних клітин у місцях їх розмноження, викид цих клітин у кров'яне русло та появу пухлин в різних частинах тіла.

Джерелом збудника лейкозу є хворі тварини на будь-якій стадії розвитку інфекції. Основним фактором передачі вірусу є кров. Тому всі маніпуляції з кров'ю в господарстві є небезпечними щодо розповсюдження хвороби (кастрації, нумерація, відбір крові для лабораторних досліджень, щеплення тварин без інактивації інструментів тощо).

Хвороба в своєму розвитку має чотири стадії (періоди): латентний, продормальний, гематологічний і клінічний з проявом зформованих пухлин.

Найбільш небезпечними, як джерело інфекції, є тварини в латентній стадії хвороби, коли в сироватці крові ще недостатній рівень противірусних антитіл для їх виявлення лабораторними методами. Такі тварини залишаються в стадії як здорові і заражають підрастаючий молодняк та ще не інфікованих корів.

На щеплену вакцину «Лейкозав» у організмі тварин формується активний противірусний імунітет, який захищає їх від експериментального та спонтанного зараження [3]. Наявність антитіл в сироватці крові хворої чи щепленої вакциною тварини визначається за допомогою реакції імунодифузії (РІД) проти стандартного лейкозного антигену. Однак за допомогою РІД неможливо визначити походження антитіл (вакцини чи сформовані в результаті захворювання).

В Нікопольському районі Дніпропетровської області було щеплено 573 РІД-позитивних корів, селян приватного сектора, 35 населених пунктів. Тварин щеплювали двічі з інтервалом 6 місяців. Через 12 місяців після першого введення вакцини всіх тварин дослідили за РІД та гематологічно. Сироватки крові від 406 корів (70,85 %) не реагували позитивно в РІД із стандартним лейкозним антигеном. РІД-позитивними виявились 167 корів (29,15 %). За результатами гематологічних досліджень гемхворих не було.

Сироватки крові від трьох корів, які до імунізації вакциною реагували в РІД позитивно, а після щеплення – негативно, дослідили за полімеразно ланцюговою реакцією (ПЛР). Вірусу лейкозу в крові цих тварин не виявили.

Отримані нами результати досліджень були несподіваними, адже літературні джерела стверджують, що незалежно від терміну часу РІД-позитивні (інфіковані вірусом) тварини є вірусоносіями і повинні бути зданими на забій [4].

У даному випадку після імунізації РІД-позитивних корів вакциною більш як у 70 % з них не виявили антитіл проти вірусу лейкозу. Щоб спростувати або підтвердити тезу, що РІД-позитивні тварини на все життя залишаються вірусоносіями ми провели більш широке дослідження крові від РІД-позитивних корів за полімеразною ланцюговою реакцією.

Мета роботи. За допомогою полімеразно ланцюгової реакції дослідити кров від РІД-позитивних та РІД-негативних корів, щеплених інактивованою вакциною «Лейкозав» проти лейкозу великої рогатої худоби, на наявність вірусу лейкозу.