

ГЛАВА 3.1.11.

ПАРАТУБЕРКУЛЕЗ
(Болезнь Ионе)

РЕЗЮМЕ

*Паратуберкулез (болезнь Ионе) – это хронический энтерит жвачных животных, вызываемый патогеном *Mycobacterium avium* подвида *paratuberculosis* (MAP).*

Идентификация агента: *Диагностика паратуберкулеза делится на две части: диагностика клинической болезни и обнаружение субклинической инфекции. Последнее важно для борьбы с болезнью на уровне фермы, а также на национальном или международном уровне.*

Диагноз паратуберкулез ставят на основании клинических признаков и подтверждают демонстрацией MAP в фекалиях с помощью микроскопа или с использованием ДНК-зондов и полимеразной цепной реакции. Диагноз ставят при вскрытии в результате обнаружения характерных для данной болезни поражений в кишечнике, либо путём демонстрации типичных кислотоустойчивых организмов в мазках-отпечатках, либо с использованием гистологических методов, или путём выделения MAP в культуре.

Обнаружение субклинической инфекции зависит от выделения специфических антител серологическими методами или культивирования MAP из фекалий или тканей, собранных при аутопсии, или демонстрации клеточно-опосредованных реакций. Выбор теста зависит от обстоятельств и степени чувствительности, необходимой на уровне отдельного животного или стада.

Культуры MAP можно получить из фекалий или тканей после обработки с целью устранения контаминантов путём посева в искусственные среды со специфическим фактором роста микобактерином, который важен для роста MAP.

Серологические исследования: *Борьба с паратуберкулезом является трудной задачей из-за продолжительного течения инфекции, преимущественно субклинической природы болезни и нехватки тестов для точного выявления субклинически инфицированных животных.*

К серологическим исследованиям, которые обычно используются для диагностики паратуберкулеза у крупного рогатого скота, относятся иммуноферментный анализ (ИФА), реакция связывания комплемента (РСК), и реакция иммунодиффузии в агаровом геле (AGID). Чувствительность и специфичность часто определяют по результатам культивирования в фекалиях, которое само по себе обладает неизвестной чувствительностью у субклинически инфицированного крупного рогатого скота. Некоторые тесты, например, ИФА, показывают очень хорошие результаты, если используются с целью подтверждения диагноза паратуберкулез у коров с типичными клиническими признаками.

Исследования на наличие клеточно-опосредованного иммунитета: *Используются анализ высвобождения гамма-интерферона и реакция гиперчувствительности замедленного типа (кожная проба), но интерпретация в обоих случаях затруднительна.*

Требования к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам: Вакцины против паратуберкулеза могут быть живыми аттенуированными или убитыми бактериями, либо инкорпорированными с помощью адъюванта, либо лиофилизированными и затем адъювантированными при восстановлении. Определение количества бактерий затруднено, поэтому содержание бактерий в вакцине можно определить по весу, тогда как об иммуногенности вакцины можно судить по серийному тестированию партии на сенсibilизирующие способности у морских свинок.

Безопасность вакцин или аномальную токсичность можно также исследовать на морских свинках.

Для проведения диагностических кожных проб используется джонин и птичий туберкулин – очищенные белковые продукты подвергшихся термообработке культур MAP или *M. avium*, соответственно. Джонин стандартизируют по содержанию очищенных белковых продуктов с использованием химического анализа, а его биологическую активность идентифицируют в морских свинках, сенсibilизированных MAP. Активность птичьего туберкулина устанавливают на морских свинках, сенсibilизированных с помощью *M. avium*, путём сравнения с референтным препаратом, откалиброванным в международных единицах.

А. ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель *Mycobacterium avium* подвида *paratuberculosis* (MAP) – это организм, впервые обнаруженный Ионе и Фротингэм в 1895 году. MAP вызывает паратуберкулез или болезнь Ионе, кишечную гранулематозную инфекцию (Thorel *et al.*, 1990). Паратуберкулез чаще всего выявляют у домашних жвачных животных (КРС, овцы, козы, верблюдовые и буйволы), а также у диких жвачных животных (оленьевых). Он распространён во всём мире. Болезнь также регистрировали у лошадей, свиней, кроликов, горностаев, лисиц и ласок (Greig *et al.*, 1999). В естественных условиях болезнь у крупного рогатого скота распространяется путём попадания MAP в органы пищеварения из контаминированной окружающей среды. Болезнь персистирует после введения инфицированных животных в стадо. Инфекция может распространяться вертикально на плод (Larson & Кореcky, 1970); сперма также может быть инфицирована этим организмом (Sweeney *et al.*, 1995). Главным источником инфекции для телят является молоко от инфицированных коров или молоко, контаминированное фекалиями больного скота.

Идентификация возбудителя MAP базируется на его потребности в микобактине и его связи с клиническими признаками, и определенных лабораторных результатах, например культивирования или ПЦР. Зависимость от микобактина в течение длительного времени считалась таксономической характеристикой MAP, так как большинство микобактерий способно вырабатывать микобактин для себя. Однако MAP, *M. silvaticum* и некоторые первичные изоляты *M. avium* не обладают такой способностью и требуют выращивания микобактина в лаборатории. Таким образом, потребность в микобактине присуща не только MAP; эта характеристика присутствует в различной степени в группе *M. avium*.

Клиническими признаками паратуберкулеза являются медленно прогрессирующее истощение и диарея, которая сначала носит перемежающийся характер, постепенно становится более тяжёлой, а затем уже присутствует у крупного рогатого скота постоянно. Диарею также регистрируют как клинический признак у выращиваемых на ферме оленей. Диарея менее характерна для мелких жвачных животных.

Ранние поражения возникают на стенках тонкого кишечника и в дренирующих брыжеечных лимфатических узлах, и на данном этапе инфекция ограничивается этими участками. По мере прогрессирования болезни макроскопические поражения возникают в подвздошной кишке, тонкой кишке, конечной части тонкого кишечника, слепой кишке и ободочной кишке, а также в брыжеечных лимфатических узлах. *MAP* присутствует в поражениях, и, в конечном итоге, во всем теле. Поражения в кишечнике являются причиной утечки белка и возникновения синдрома пониженного всасывания белка, что ведёт к истощению мышц. Клинические признаки обычно впервые появляются у молодых животных на стадии взросления, но болезнь может также иметь место у животных старше 1 – 2 лет, а у молочного скота ее часто отмечают у животных в возрасте 3 – 5 лет.

В течение нескольких недель инфекции в стенках тонкого кишечника начинается фаза размножения возбудителя *MAP*. В зависимости от резистентности отдельного животного эта инфекция или исчезает, или животное остаётся инфицированным как здоровый носитель. Процент животных этих категорий неизвестен. Более поздняя стадия размножения организмов в носителях ведёт к расширению поражений, вмешательству в обмен веществ в кишечнике и появлению клинических признаков болезни. Субклинические носители выделяют с фекалиями разные количества *MAP*. В большинстве случаев по мере развития клинической формы болезни выделяется всё большее количество организмов.

Клеточно-опосредованные иммунные реакции поддаются обнаружению на ранних стадиях инфекции и продолжают присутствовать у части субклинически инфицированных носителей, но по мере развития болезни клеточно-опосредованные иммунные реакции ослабевают и могут отсутствовать в клинических случаях. Сывороточные антитела обнаруживаются на более поздних сроках по сравнению с клеточно-опосредованными иммунными реакциями. Они могут также присутствовать у носителей, которые перенесли инфекцию. Сывороточные антитела присутствуют более постоянно и приобретают более высокий титр по мере того, как поражения становятся более обширными, отражая количество присутствующего антигена. У овец может наблюдаться серологический ответ, который более вероятно будет выявлен при мультибактериальной, чем при олигобациллярной форме болезни.

Другие микобактериальные болезни и инфекции, включающие туберкулёз млекопитающих и птиц, тоже вызывают клеточно-опосредованные иммунные реакции и выработку сывороточных антител. Отсюда следует, что эти болезни необходимо дифференцировать от паратуберкулеза как клинически, так и с помощью специфических диагностических тестов. Заражение сапрофитными микобактериями из окружающей среды также может стать причиной чувствительности сельскохозяйственного скота, приводя к неспецифическим клеточно-опосредованным иммунным реакциями.

Животные, вакцинированные против паратуберкулеза, вырабатывают и клеточно-опосредованные иммунные реакции, и сывороточные антитела. Вакцинация – это помощь в предотвращении клинической болезни, но она необязательно предупреждает инфекцию. Она также служит препятствием при выполнении программ по диагностике и борьбе с туберкулёзом крупного рогатого скота. Таким образом, если необходимо диагностировать инфекцию у вакцинированных животных, можно использовать только тесты по обнаружению *MAP* в образцах фекалий или тканей.

У отдельных животных, особенно из хозяйства, где болезнь ранее не регистрировалась, предварительный клинический диагноз может быть подтверждён с помощью лабораторных тестов. Однако окончательный диагноз может быть поставлен только на

основании клинических признаков, если эти клинические признаки являются типичными для данной болезни, и если известно, что эта болезнь присутствует в стаде. Подтверждение паратуберкулеза зависит от обнаружения или макроскопических поражений с демонстрацией типичных кислотоустойчивых организмов в мазках-отпечатках, или микроскопических патогномичных поражений и выделения в культуре *MAR*.

MAR классифицируется как Группа риска 2 инфицирования человека, и с возбудителем следует обращаться при соблюдении надлежащих мер, описанных в Главе 1.1.4. *Биозащита и биобезопасность: Стандарт управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и в виварии.* Меры по биологическому сдерживанию должны быть определены анализом риска, как описано в Главе 1.1.4.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследования, доступные для диагностики паратуберкулеза и их назначение

Метод	Назначение					
	Благополучие популяции по инфекции	Индивидуальное благополучие животного от инфекции до перемещения	Вклад в стратегию искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя¹						
Гистопатология*	+	-	+	+++	-	-
Окрашивание фекалий по ЦН	-	-	-	+	-	-
Культивирование	+++	+++	+	+++	+	-
ПЦР	+	+	+	++	+	-
Выявление иммунного ответа²						
AGID	++	-	+	+	+++	+++
ИФА	++	+	+	+	+	+++
РСК	-	+	+	+	+	+++
Анализ высвобождения γ -интерферона	-	-	+	-	-	+++
ГЗТ	-	-	+	-	-	+++

Объяснение: +++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может использоваться в некоторых ситуациях, но затраты, надежность или другие факторы значительно ограничивают его применение; - = не подходит для этих целей; * = только при аутопсии; ** = подходит для использования у овец и коз; Хотя не все исследования, перечисленные в категории +++ или ++ не прошли официальную валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они широко используются без сомнительных результатов, делает их пригодными; ЦН = Циль-Нильсен; ПЦР = полимеразная цепная реакция; AGID = реакция иммунодиффузии в агаровом геле; ИФА = иммуноферментный анализ; РСК = реакция связывания комплемента; ГЗТ = гиперчувствительность замедленного типа.

С целью диагностирования присутствия паратуберкулеза у отдельного подозрительного с клинической точки зрения животного можно использовать ряд лабораторных тестов,

¹ Рекомендуется комбинация методов идентификации возбудителя, применяемых на одном и том же клиническом образце.

² Рекомендуется комбинация перечисленных серологических исследований.

включающих: фекальные мазки, культивирование фекалий и тканей, ДНК-зонды с использованием фекалий или тканей, серологические методы, аутопсию и гистологию (Таблица 1).

Тесты по обнаружению субклинической инфекции на уровне стада проводятся с целью определения распространённости инфекции обычно для того, чтобы можно было применить меры по борьбе с болезнью. Поскольку ни один тест не является на 100% чувствительным или специфичным, борьба с болезнью путём уничтожения животных - бациллоносителей зависит от проведения повторных тестов с 6-месячным или годовым интервалом в течение ряда лет, и ликвидации животных с положительной реакцией в серологических тестах или животных, выделяющих организмы с фекалиями. Благоразумным можно считать также уничтожение потомства от маток с положительной реакцией. Даже эти процедуры не всегда являются успешными без внесения изменений в практики гигиены и содержания сельскохозяйственного скота с целью снижения уровня передачи инфекции в пределах стада. Схожие стратегии исследования с повторяющимися тестами на уровне стада также можно применять в рамках контрольных программ по оценке возможности благополучия по инфекции на уровне стада, тем самым идентифицируя стада с более низким риском в целях безопасной торговли.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Аутопсия

Паратуберкулез не может быть диагностирован на основе поверхностного обследования кишечника на наличие признаков утолщения. Кишечник должен быть вскрыт от двенадцатиперстной кишки до прямой с целью обнажения слизистой оболочки. Не всегда существует тесная корреляция между тяжестью клинических признаков и степенью кишечных поражений. Слизистая оболочка, особенно конечной части подвздошной кишки, осматривается на наличие характерных для данной болезни признаков утолщения и сморщивания. Ранние поражения видны при просматривании кишечника на свет, когда можно различить разрозненные бляшки. Гиперемия слизистой оболочки, эрозии и петехиальное кровоизлияние наблюдались у оленей, пораженных паратуберкулезом. Поражения на самой ранней стадии представляют собой утолщение и закручивание лимфатических протоков. Брыжеечные лимфоузлы обычно увеличены и отёчны. Казеозные и/или кальцифицированные поражения в брыжеечных лимфоузлах обычно наблюдаются у коз, и в меньшей степени у овец (Fodstad & Gunnarsson, 1979). Мазки с поражённой слизистой и срезаемых поверхностей лимфоузлов необходимо окрашивать с использованием метода по Цилю-Нильсену и исследовать с помощью микроскопа на наличие кислотоустойчивых организмов, обладающих морфологическими характеристиками *MAR*. Однако кислотоустойчивые организмы не присутствуют во всех случаях. Поэтому диагноз лучше всего подтверждать путём сбора многочисленных образцов стенки кишечника и мезентериальных лимфоузлов в фиксатор (10% солевой раствор формалина) для последующего гистологического исследования. Необходимо изучать и срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, и срезы, окрашенные по Цилю – Нильсену. Характерные для болезни поражения состоят из инфильтрации соединительного тканевого слоя слизистой оболочки, подслизистой оболочки, пейеровых бляшек и наличия в корковом слое брыжеечных лимфоузлов с крупными макрофагами, также известными как эпителиоидные клетки и многоядерные гигантские клетки, в которых, в тех и других, обычно, но не всегда, обнаруживают скопления кислотоустойчивых бацилл или отдельные кислотоустойчивые бациллы.

1.2. Бактериология (микроскопия)

Окрашенные по Цилю – Нильсену мазки фекалий исследуют с помощью микроскопа. Диагноз паратуберкулез можно поставить, если обнаружены скопления (три или более организмов) небольших (0,5-1,5 мкм) кислотоустойчивых бацилл. Присутствие одиночных кислотоустойчивых бацилл в отсутствие скоплений является сомнительным диагнозом. Недостатком этого теста является то, что он не дифференцирует другие микобактериальные виды, и только небольшой процент случаев может быть подтвержден с помощью микроскопического исследования одного образца фекалий.

1.3. Бактериология (культивирование)

Выделение *MAR* от животного гарантирует окончательный диагноз инфицирования этим организмом. Несмотря на то, что культивирование технически трудный и длительный процесс, оно является единственным тестом, который не продуцирует ложноположительных результатов (100% специфичность). Однако вследствие феномена потенциального переноса, теоретически возможно, что исследование фекальной культуры от неинфицированных животных в контаминированных объектах может привести к ложноположительным результатам (Nielsen & Toft, 2008).

Культивирование в фекалиях - это наилучший тест для диагностики паратуберкулеза у живых животных (больных животных). В действительности этот метод культивирования в фекалиях позволяет выявлять большинство животных на продвинутых стадиях болезни, но идентифицирует небольшое количество животных на ранних стадиях инфекции (Nielsen & Toft, 2008). В зависимости от условий, чувствительность фекальной культуры составляет 70% для больного КРС, 74% для инфекционного КРС и 23 – 29% для инфицированного КРС. Культивирование тканей от КРС, овец и коз на *MAR* является более чувствительным, чем гистопатологическое исследование (Fodstad & Gunnarsson, 1979; Koh *et al.*, 1988; Whittington *et al.*, 1999).

Существует несколько методов культивирования, которые варьируют в зависимости от среды и протоколов обработки пробы. Культивирование *MAR* всегда проводится с помощью специальной среды, обогащенной микобактерином J, который является коммерчески доступным.

Организмы *MAR* значительно уступают в численности другим бактериям или грибам в образцах фекалий и кишечных тканей. Успешное выделение *MAR* из таких проб зависит от эффективной инактивации этих нежелательных организмов. Оптимальный метод деконтаминации должен иметь минимальный тормозящий эффект на рост *MAR*. Было продемонстрировано, что протоколы рутинной деконтаминации уменьшают количество организмов *MAR*, выделенных из пробы, на приблизительно $2,7 \log_{10}$ и $3,1 \log_{10}$ для фекалий и тканей, соответственно.

Существуют два основных метода традиционного культивирования *MAR*: метод с использованием щавелевой кислоты и NaOH для деконтаминации и среды Löwenstein-Jensen для выращивания, и метод с использованием хлорида гексадецил пиридиния (НРС) для деконтаминации в сочетании со средой Herrold из яичного желтка (HEYM) или Middlebrook 7H10, а также жидких сред, таких как Middlebrook 7H9 или коммерческих эквивалентов для выращивания. Несмотря на публикации о

том, что НЕУМ способствует росту изолятов *MAR* от КРС значительно лучше, чем LJ, недавние исследования продемонстрировали, что определенные штаммы растут лучше на средах LJ или Middlebrook. Преимущество среды 7H10 заключается в том, что она лучше поддерживает рост овечьих штаммов по сравнению с НЕУМ. Жидкие среды, по сообщениям, являются более чувствительными, чем твердые среды, как в отношении овечьих штаммов, так и в отношении штаммов КРС.

Первичные колонии *MAR* на твердых питательных средах могут появиться в любое время в период от 5 недель до 6 месяцев после заражения. Овечьи штаммы, включая необычные ярко-жёлтые пигментированные типы, растут хуже, чем штаммы КРС на обычно используемых средах, таких как НЕУМ или LJ, а первичные культуры нельзя отбраковывать как отрицательные без продолжительной инкубации. Твердая питательная среда Middlebrook 7H10, обогащенная яичным желтком и микобактерином, отлично подходит для культивирования овечьих штаммов *MAR* (Whittington et al., 1999).

Первичные колонии штамма КРС *MAR* на среде НЕУМ это очень маленькие, полусферические, мягкие, немуконидные и первоначально бесцветные и прозрачные. Размер колонии сначала очень незначителен. Он может оставаться 0,25-1 мм в размере, с тенденцией к отсутствию роста, при этом колонии будут многочисленны на скошенном агаре. Границы колонии круглые и ровные, а их поверхности гладкие и блестящие. По мере продолжения инкубации колонии становятся больше, более выпуклыми, непрозрачными, от грязно белого до светло-коричневого или бежевого цвета. Более старые изолированные колонии могут достигать 2 мм. Морфология колоний со временем меняется с гладкой на шероховатую и с полусферической на имеющую округлые выступы.

На модифицированной среде 7H10 колонии штамма КРС менее выпуклые, чем на НЕУМ, особенно на старых культурах. Они малы в размере, приблизительно до 1 мм в диаметре и, будучи светло-коричневого цвета, немного светлее среды. По сравнению с колониями штаммов КРС на НЕУМ, колонии на 7H10 труднее для выявления. Колонии овечьего штамма *MAR* на модифицированной 7H10 выпуклые, мягкие, влажные, блестящие, от грязно белого до светло-коричневого цвета и очень схожи с цветом среды. Колонии типично очень незначительны в размере от булавочной головки до 0,5 мм, но могут достигать 1 мм и редко 1,5 мм, если на скошенном агаре возникает несколько колоний.

Сапрофитные микобактерии могут иметь схожий внешний вид на любой среде, но часто заметны через 5 – 7 дней.

Для идентификации *MAR* небольшое количество инокулума подозрительных колоний следует субкультивировать на той же среде с микобактерином и без него с целью демонстрации зависимости от микобактерина. Микобактерин присутствует в клеточной стенке организма, и большое количество инокулума может содержать достаточно микобактерина для содействия росту *MAR* на среде, которая не содержит микобактерина. Кроме того, следует применять подтверждение в ПЦР (нацелена на IS900 или F57) для идентификации изолятов *MAR*.

1.3.1. Среда

Примерами подходящих сред могут служить:

i) *Среда Herrold из яичного желтка с микобактерином*

На 1 литр среды: 9 г пептона; 4,5 г хлорида натрия; 2,7 г экстракта говядины; 27 мл глицерина; 4,1 г пирувата натрия; 15,3 г агара; 2 мг микобактерина; 870 мл дистиллированной воды; шесть яичных желтков (120 мл) и 5,1 мл 2% водного раствора малахита зелёного. Взвесить первые шесть ингредиентов и растворить в дистиллированной воде при подогревании. Довести рН жидкой среды до 6,9-7,0 с помощью 4% NaOH и протестировать с тем, чтобы удостовериться, что рН твёрдой фазы составляет 7,2-7,3. Добавить микобактерин, разведённый в 4 мл этилового спирта. Автоклавировать при 121°C в течение 25 минут. Охладить до 56°C и асептическим способом добавить шесть стерильных яичных желтков³ и стерильный раствор малахита зелёного. Осторожно перемешать и распределить по стерильным пробиркам.

Разрешается добавлять 50 мг хлорамфеникола, 100 000 Е пенициллина и 50 мг амфотерицина В.

ii) *Модифицированная среда Dubos*

На 1 литр среды: 2,5 г казиминовых кислот; 0,3 г аспарагина; 2,5 г безводного динатрий водород фосфата; 1 г калий диводород фосфата; 1,5 г цитрата натрия; 0,6 г кристаллического сульфата магния; 25 мл глицерина; 50 мл 1% раствора Твин 80 и 15 г агара. Растворить каждую соль в дистиллированной воде при минимальном подогреве и довести раствор до 800 мл. Добавить микобактерин в спиртовом растворе при 0,05% (2 мг растворить в 4 мл этилового спирта), нагреть среду до 100°C свободно проходящим паром, а затем стерилизовать автоклавированием при 115°C в течение 15 минут. Охладить до 56°C на водяной бане, добавить антибиотики (100 000 Е пенициллина; 50 мг хлорамфеникола и 50 мг амфотерицина В) и сыворотку (200 мл бычьей сыворотки, простерилизованной фильтрацией через прокладку Seitz "EX" и инактивированной термическим образом при 56°C в течение 1 часа). Среду тщательно перемешать, а затем распределить по стерильным пробиркам. Преимуществом данной среды является то, что она прозрачная, а это облегчает раннее обнаружение колоний.

iii) *Модифицированная среда Middlebrook 7H10 и 7H9*

Можно использовать среды Middlebrook с добавлением микобактерина и различными коммерчески доступными добавками. Дополнительные консультации по составу можно получить в Справочных лабораториях МЭБ.

iv) *Среда Löwenstein-Jensen с микобактерином или без него.*

³ Используйте свежие яйца, которые были снесены не более чем за 2 дня до этого, из стада, не получавшего антибиотики. С помощью щётки промойте яйца водой, содержащей моющее средство. Ополосните водой и поместите яйца в 70° спирт на 30 минут. Высушите, поместив их между двумя стерильными полотенцами. С помощью пинцета Адсона (крысиный зуб) разбейте один конец яичной скорлупы, сделав отверстие приблизительно 10 мм, и удалите белок, используя пинцет и силу тяжести. Сделайте отверстие больше и нарушите целостность желтка. Перемешайте яичный желток путём вращения пинцета и удалите яичный мешок. Вылейте перемешанный яичный желток в среду.)

1.3.2. Приготовление пробы

i) Обработка образцов ткани

Не следует использовать химические консерванты. Ткани можно замораживать при -20°C .

Во избежание контаминации фекалии следует перед отправкой в лабораторию отмывать от частичек тканей кишечного тракта.

a) **Метод расщепления/осаждения для деконтаминации тканей**

Приблизительно 4 г слизистой из подвздошно-слепокишечного клапана или 4 г брыжеечного узла поместить в стерильный сосуд смесителя, содержащий 50 мл трипсина (2,5%). Смесь нейтрализовать с использованием 4% NaOH и pH бумаги и перемешивать в течение 30 минут при комнатной температуре с помощью магнитной мешалки. Расщеплённую смесь фильтровать через марлю. Фильтрат центрифугировать приблизительно при 2000-3000 *g* в течение 30 минут. Надосадочную жидкость слить и выбросить. Осадок ресуспендировать в 20 мл 0,75 % НРС и дать отстояться, не трогая, в течение 18 часов при комнатной температуре. Частицы, которые осаждаются на дно пробирки, следует использовать в качестве инокулума и удалить пипеткой, не затрагивая надосадочную жидкость. В качестве альтернативы можно использовать другие методы деконтаминации, как например обработка 5% щавелевой кислотой.

b) **Метод двойной инкубации для деконтаминации тканей**

Около 2 г пробы ткани (очищенной от жира) нарезать тонко, используя стерильное лезвие скальпеля или ножницы, и гомогенизировать в течение 1 минуты в 25 мл 0,75% НРС. Позволить пробе отстояться, чтобы пена и крупные кусочки ткани выпали в осадок. Вылить гомогенат ткани в центрифужную пробирку с осторожностью, чтобы в нее не попал жир и крупные кусочки ткани. Дать отстояться в течение 30 минут, затем перенести 10 мл суспензии, взятой непосредственно над осадком, в 30 мл пробирку и инкубировать в течение 3 часов при 37°C . Центрифугировать в течение 30 минут при 900 *g*, удалить надосадочную жидкость и ресуспендировать пеллету в 1 мл смеси антибиотиков, содержащей по 100 мкг ванкомицина, амфотерицина и налидиксовой кислоты (VAN). Инкубировать в течение ночи при 37°C . Использовать суспензию для инокуляции среды, как описано выше.

c) **Инокуляция культуральных сред и инкубация**

Приблизительно 0,1 мл инокулума перенести на каждую из трёх скошенных питательных сред Herrold, содержащих микобактин, и на одну скошенную питательную среду Herrold без микобактина. Инокулум распределить равномерно по поверхности скошенных сред. Пробирки оставить в наклонном положении при 37°C приблизительно на неделю с незакрученными колпачками. Вернуть пробирки в вертикальное положение, когда со срезов выпарится свободная влага. Крышки завинтить, а пробирки поместить в корзинках в инкубатор на 37°C .

Яйцо в среде Herrold обеспечивает то количество фосфолипидов, которое достаточно для нейтрализации бактерицидной активности остаточного хлорида гексадецил пиридиния в инокууме. Другие среды (модифицированные среды Dubos и Middlebrook) не обладают таким свойством. С целью деконтаминации образца можно использовать другие виды обработок, например, обработку 5% щавелевой кислотой.

Хлорид гексадецил пиридиния является относительно неэффективным средством для контроля роста контаминирующих грибов. Было обнаружено, что амфотерицин В (фунгизон) эффективно борется с чрезмерным ростом грибов в инокулированных средах. Фунгизон можно включать в среду Herrold в конечной концентрации 50 мкг на один мл среды. Из-за снижения антигрибковой активности хранение среды Herrold, содержащей фунгизон, следует ограничивать до 1 месяца при 4°C.

Скошенные питательные среды инкубируют в течение 15-20 недель и проводят еженедельное наблюдение, начиная с шестой недели.

ii) Обработка фекальных образцов

Не следует использовать химические консерванты. Фекальные образцы можно замораживать при – 70°C.

а) Суспендирование и деконтаминация фекалий

1 г фекалий перенести в 50 мл пробирку, содержащую 20 мл стерильной дистиллированной воды. Смесь встряхивать в течение 30 минут при комнатной температуре. Частицам более крупного размера позволить осесть в течение 30 минут. Пять мл самого верхнего слоя фекальной суспензии перенести в 50 мл пробирку, содержащую 20 мл хлорид гексадецил пиридиния. Пробирку несколько раз перевернуть с тем, чтобы добиться однородного распределения, и оставить постоять в спокойном состоянии в течение 18 часов при комнатной температуре.

б) Инокуляция культуральных сред

0,1 мл ненарушенного осадка перенести на каждую из четырёх скошенных питательных сред Herrold, три из которых с микобактерином и одна без микобактерина. С осадка можно снять мазок и окрасить с помощью метода Циля-Нильсена.

с) Инкубирование и наблюдение за скошенными питательными средами

Используются те же самые процедуры, что и для образцов ткани.

Вариации вышеупомянутых методов были уже описаны (Collins *et al.*, 1990; Merkal *et al.*, 1968). Чувствительность культуры можно повысить применением жидких сред и центрифугированием, а не с помощью осаждения. Метод двойной инкубации, описанный Whitlock *et al.* (1991) помогает деконтаминировать инокулум и обеспечивает более высокую чувствительность, чем протоколы осаждения и фильтрации (Eamens *et al.*, 2000). Метод двойной инкубации включает смешивание 2 г

фекалий с 15 мл физиологического раствора или воды, затем осаждение в течение 30 минут и перенос (избегая волокнистых веществ) 5 мл верхней части суспензии в 25 мл 0,9% НРС в сердечно-мозговой экстракт 50% крепости. После инкубации при 37°C в течение 16 – 24 часов смесь центрифугируют при 900 *g* в течение 30 минут (при комнатной температуре), надосадочную жидкость удаляют и пеллету ресуспендируют в 1 мл VAN. Смесь инкубируют в течение 24 – 72 часов при 37°C и используют для инокуляции среды, как описано выше.

1.4. ДНК-зонды и полимеразная цепная реакция

В настоящее время разрабатываются ДНК-зонды, позволяющие обнаруживать *MAP* в диагностических пробах и быстро идентифицировать бактериальные изоляты (Ellingson *et al.*, 1998). Их использовали для различения *MAP* и других микобактерий.

McFadden *et al.* идентифицировали последовательность (McFadden *et al.*, 1998), названную *IS900*, которая является инсерционной последовательностью, специфичной для *MAP*. Имели место сообщения о том, что небольшое число изолятов, но не *MAP*, продуцировали амплифицированные продукты того же размера, который ожидался от *MAP*. Расщепление с помощью фермента рестрикции можно использовать применительно к положительным *IS900* продуктам для подтверждения того, что их последовательность совпадает с *MAP*.

Выявление новых последовательностей ДНК, считающихся уникальными для *MAP* (*ISMav2*, *f57* и *ISMap02*), предоставляет дополнительную возможность для быстрой идентификации этого организма с помощью технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Stabel & Bannantine, 2005; Strommenger *et al.*, 2001; Vansnick *et al.*, 2004). Рестрикционный анализ *IS1311*, инсерционной последовательности общей для *M. avium* и *MAP*, можно использовать для различения между этими видами и для типирования штаммов *MAP* овец, КРС и бизонов (Sevilla *et al.*, 2005; Whittington *et al.*, 1998).

За последние годы широко разрабатывались методы ПЦР в реальном времени для выявления *MAP* в различных пробах (кровь, молоко, фекалии, ткани и образцы окружающей среды). Этот метод быстр и дает надежду на выявление прихотливых и медленно растущих микроорганизмов, таких как *MAP*. Однако этот молекулярный инструмент чрезвычайно зависит от качества проб нуклеиновой кислоты. Поэтому метод экстрагирования ДНК, который обеспечивает высококачественный образец ДНК и максимальное извлечение бактериальной ДНК, является важным шагом в использовании ПЦР в реальном времени (Parka *et al.*, 2014).

Дальнейшие работы, которые охватывали усовершенствование методов ПЦР и экстрагирование ДНК, продемонстрировали, что этот метод может занять важное место в диагностике и контроле болезни Йоне у КРС (Leite *et al.*, 2013).

Коммерческие диагностические ПЦР тесты для выявления *MAP* в пробах молока и фекалий доступны в продаже, но пользователи должны учитывать интерпретацию полученных данных и их пригодность своему назначению до применения.

2. Серологические тесты

К серологическим тестам, которые обычно применяются для диагностики паратуберкулеза у крупного рогатого скота, относятся реакция связывания комплемента

(РСК), твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунодиффузия в агаровом геле (AGID) (Sockett *et al.*, 1992). Международной сыворотки, которую можно использовать в качестве стандартной, не существует.

2.1. Иммуноферментный анализ

ИФА является в настоящее время наиболее чувствительным и специфичным тестом для обнаружения антител к *MAP* у КРС. Его чувствительность сравнима с чувствительностью РСК в клинических случаях, но выше, чем чувствительность РСК при тестировании субклинически инфицированных носителей. Специфичность ИФА повышается абсорбцией сывороток *M. phlei*. На основе абсорбирующего ИФА, разработанного Yokomizo *et al.* (1983, 1985) и модифицированного Milner *et al.* (1988), был создан коммерческий набор Cox *et al.* (1991).

ИФА выявляет около 30 – 40 % КРС, в отношении которого с помощью культивирования в фекалиях на твердых средах было установлено, что он инфицирован (Whitlock *et al.*, 2000). Подобно методам культивирования, чувствительность ИФА зависит от уровня выделения *MAP* с фекалиями и возраста животных. Крупное исследование, проведенное в Австралии, продемонстрировало, что действительная чувствительность ИФА у 2-, 3- и 4-летних коров составляла 1,2%, 8,9% и 11,6% соответственно, но оставались между 20 и 30% в более старших возрастных группах (Jubb *et al.*, 2004). Было подсчитано, что общая действительная чувствительность для всех возрастных групп составляет 15% (Jubb *et al.*, 2004, Whitlock *et al.*, 2000). У КРС чувствительность ИФА находилась в диапазоне от 9 до 94%, а специфичность ИФА была 79 – 100% (Nielsen & Toft, 2008).

Абсорбирующий ИФА сочетает чувствительность ИФА с дополнительной специфичностью этапа абсорбции. Тестируемые сыворотки разводят буфером, содержащим растворимый антиген *M. phlei*, до того, как проводить непрямой ИФА. Эта процедура устраняет неспецифические перекрёстно реагирующие антитела. В ранних версиях сыворотки абсорбировались цельным возбудителем *M. phlei*, который перед тестированием выводился центрифугированием.

Был разработан формат титрационного микропланшета, при котором антиген *MAP* наносится на 96-луночные планшеты. Пробы разводят в разбавителе, содержащем *M. phlei* для удаления перекрёстно реагирующих антител. При инкубации разведённой пробы в сенсibilизированной лунке антитела, специфические для *MAP*, образуют комплекс с сенсibilизирующими антигенами. После отмывки с лунок несвязанных материалов добавляют меченый пероксидазой хрена антибиотический иммуноглобулин. Он вступает в реакцию с иммуноглобулинами, прикрепленными к твердофазному антигену. Уровень конверсии субстрата пропорционален количеству связанного иммуноглобулина. Последующее окрашивание, измеряемое (при длине волны соответствующей используемому хромогену) спектрофотометрическим способом, пропорционально количеству антител, присутствующих в опытной пробе.

Несколько тест-систем на основе абсорбирующего ИФА можно приобрести коммерческим путём. Сам метод и необходимые опытные материалы, интерпретация результатов и подсчёты полностью описаны в инструкциях, которые сопровождают коммерческий набор. Сообщалось о нескольких коммерчески доступных ИФА со схожей чувствительностью и специфичностью. Некоторые коммерческие наборы предлагают опцию тестирования проб молока. Было обнаружено, что ИФА на коровьем и овечьем молоке имеет специфичность, схожую с сывороточной ИФА, но

менее чувствительную, чем анализ крови (Hendrick *et al.*, 2005; Salgado *et al.*, 2005). У КРС чувствительность ИФА на молоке находится в диапазоне 21 – 61 %, а специфичность такого ИФА составляет 83 – 100% (Nielsen & Toft, 2008).

2.2. Реакция связывания комплемента

В течение многих лет РСК была стандартным тестом, используемым для крупного рогатого скота. РСК показывает хорошие результаты у клинически подозрительных животных, но не обладает достаточной специфичностью для применения в общей популяции с целью контроля. Тем не менее, часто спрос на неё поступает из стран, импортирующих крупный рогатый скот. Целый ряд процедур РСК используется на международном уровне. Примером микротитрационного метода для проведения РСК может служить следующее:

2.1.1. Процедура исследования

- i) Антиген представлен в виде водного экстракта бактерий, из которых удалён липид (штамм *M. paratuberculosis* 316F). Можно также использовать *Mycobacterium avium* D9.
- ii) Все сыворотки инактивировать на водяной бане при 60°C в течение 30 минут и развести в соотношении 1/4, 1/8 и 1/16. На каждой планшете должна быть положительная контрольная сыворотка и отрицательная контрольная сыворотка. Приготовить также следующие контроли: контроль антигена, контроль комплемента и контроль гемолитической системы.
- iii) Восстановленный лиофилизированный комплемент развести до такой степени, чтобы он содержал шестикратную N_{50} (50% гемолизирующую дозу), вычисленную титрованием по отношению к антигену.
- iv) Овечьи эритроциты, 2,5%, сенсibilизировать 2 единицами N_{100} гемолизина.
- v) Все разведения и реактивы готовить в кальций/магниевом вероналовом буфере; 25 мкл каждого реактива перенести на 96-луночные титрационные микропланшеты с круглым дном.
- vi) Первичное инкубирование проводить при 4°C в течение ночи и вторичное инкубирование проводить при 37°C в течение 30 минут.
- vii) *Считывание и интерпретация результатов:* Планшеты можно оставить постоять с тем, чтобы выпал осадок, или центрифугировать и считывать результаты следующим образом: 4+ = 100% фиксация, 3+ = 75% фиксация, 2+ = 50% фиксация, 1+ = 25% фиксация и 0 = полный гемолиз. Титр опытных сывороток выражается как обратное значение наивысшего разведения сыворотки, дающего 50% фиксацию. Реакция 2+ при 1/8 считается положительной. Результаты должны интерпретироваться в соответствии с клиническими признаками и другими лабораторными результатами.

2.3. Реакция иммунодиффузии в агаровом геле

Реакция иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) применима для подтверждения болезни у подозрительного с клинической точки зрения крупного рогатого скота,

овец и коз. Сообщалось, что у MPC в Новой Зеландии и Австралии AGID обеспечивает немного более высокую специфичность и чувствительность, чем получаемые при применении ИФА (Gwozdz *et al.*, 2000; Hope *et al.*, 2000; Sergeant *et al.*, 2003). Опубликованная специфичность и чувствительность AGID, подсчитываемая по гистологическим результатам, составляла 99 – 100% (95% доверительный интервал) и 38 – 56% (95% доверительный интервал) соответственно (Hope *et al.*, 2000).

Антиген, который используют в неочищенном протоплазматическом экстракте лабораторного штамма *M. avium* 18 (официально MAP 18), готовят путём разрушения клеток в аппарате для фракционирования с гидравлическим прессом. Разрушенные клетки центрифугируют при 40 000 *g* в течение 2 часов с целью выведения дебриса клеточной стенки, а фракцию надосадочной жидкости сохраняют и лиофилизируют. Этот антиген повторно суспендируют в воде в концентрации 10 мг/мл.

Агарозу растворяют в барбиталовом буфере, pH 8,6, содержащем азид натрия, до конечной концентрации агарозы 0,75%. Агарозу можно вылить в чашки Петри или на стеклянные предметные стёкла. Лунки нарезают в шестиугольной конфигурации. Диаметр лунок 4 мм, расстояние между лунками 4 мм, а высота агара должна составлять 3 – 4 мм. В центральные лунки добавляют антиген. В периферические лунки перемежающимся образом добавляют опытные, положительные и отрицательные сыворотки.

Планшеты инкубируют во влажной камере при комнатной температуре. Через 24 и 48 часов инкубации гели исследуют на наличие преципитационных линий. Появление через 48 часов или ранее одной или более чётко очерченных преципитационных линий, демонстрирующих идентичность с линиями контрольной положительной сыворотки, свидетельствует о положительном результате теста. Отсутствие каких-либо преципитационных линий свидетельствует об отрицательном результате теста. Могут иметь место неспецифические линии.

Используются несколько вариаций этого теста.

3. Исследования на наличие клеточно-опосредованного иммунитета

Выявление клеточно-опосредованного иммунного ответа предшествует выявляемой выработке антител. Животные, которые инфицированы минимально, часто не демонстрируют реакции при серологическом тестировании, но могут демонстрировать положительную реакцию в тестах, которые измеряют клеточный иммунитет. В инфицированных популяциях ожидается, что более высокое количество животных будет реагировать в исследованиях на клеточно-опосредованный иммунитет по сравнению с исследованиями на антитела, так как клеточно-опосредованный иммунитет указывает на подвержение воздействию инфекции, в то время как антитела указывают на прогресс инфекции.

3.1. Гамма-интерфероновый анализ

Анализ базируется на высвобождении гамма-интерферона из сенсibilизированных лимфоцитов в течение 18-36-часового периода инкубации со специфическим антигеном (очищенный белковый дериват птичьего туберкулина, очищенный

белковый дериват бычьего туберкулина или джонин⁴). Количественное обнаружение бычьего гамма-интерферона производится с помощью сэндвич-варианта ИФА, который использует два моноклональных антитела к бычьему гамма-интерферону. Был разработан коммерческий диагностический тест, основанный на обнаружении гамма-интерферона, для диагностики туберкулеза КРС. Метод и необходимые опытные материалы, интерпретация результатов и вычисления полностью описаны в инструкциях, прилагаемых к коммерческому набору. Этот тест еще не был валидирован производителем для диагностики паратуберкулеза. Фактически результаты, полученные исходя из этого анализа, часто трудно интерпретировать, так как отсутствует согласованность в отношении критериев и типов интерпретации и количества антигенов, используемых для стимулирования лимфоцитов крови. У КРС по имеющимся данным специфичность теста варьировалась от 94% до 67%, чувствительность находилась в пределах 13 – 85% в зависимости от критериев интерпретации (Kalis *et al.*, 2003; Nielsen & Toft, 2008).

Несколько ИФА тест-систем, доступные в продаже, предназначены для количественного определения гамма интерферона в плазме КРС, овец и коз⁵

3.2. Гиперчувствительность замедленного типа

Кожная проба на определение гиперчувствительности замедленного типа – это измерение опосредованного клетками иммунитета, но с более низкой эффективностью. Тест проводят путём внутрикожного введения 0,1 антигена в остриженный или выбритый участок, обычно сбоку средней трети шеи. В прошлом с этой целью использовали 0,1 мл очищенного белкового деривата птичьего туберкулина или джонина, так как считалось, что птичий туберкулин и джонин обладают сравнимой чувствительностью и специфичностью. Толщину кожи измеряют с помощью кронциркуля до прививки и через 72 часа после неё. Увеличение толщины кожи более чем на 2 мм следует считать индикатором присутствия гиперчувствительности замедленного типа. Следует отметить, что положительные реакции у оленей могут проявляться в виде рассеянных бляшек, а не отдельных ограниченных опухолей, а это затрудняет оценку результатов теста. У этого вида животных наличие любой опухоли следует считать положительным результатом. Однако повышение чувствительности к *M. avium* комплексу широко распространено среди животных, и ни птичий туберкулин, ни джонин не являются высокоспецифичными. Более того интерпретация кожных проб осложнена недостатком согласованности критериев интерпретации. В исследовании, в котором для исследования КРС использовался джонин, специфичность кожной пробы составляла 88,8% при пороговой величине ≥ 2 мм, 91,3% при пороговой величине ≥ 3 мм и 93,5% при пороговой величине ≥ 4 мм (Kalis *et al.*, 2003). Влияние этих пороговых величин на чувствительность не было определено. На эффективность этого теста серьезное влияние также может оказать незначительные антигеновые различия, которые возникают в различных партиях антигена (Kalis *et al.*, 2003). Необходимо проводить дальнейшие исследования для повышения эффективности кожной пробы.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

С1.Вакцины

⁴ Джонин можно купить в ID-Lelystad, Нидерланды.

⁵ Например: BioSource, Nivelles, Бельгия; ID vet Montpellier, Франция

1. Справка

Вакцины, применяемые против паратуберкулеза, включали: живые, аттенуированные, с маслом и пемзой; лиофилизированные, живые, аттенуированные, в которые после восстановления могут вводиться адьюванты, например, масло; и инактивированные высокими температурами бактерины. Основным преимуществом вакцинации является профилактика клинических случаев. Вакцинация может стать причиной возникновения реакции в месте инъекции. Также вакцинация может стать помехой для программ искоренения, основанных на иммунологическом тестировании и уничтожении животных с выявленной инфекцией, а также интерпретации реакции замедленного типа на кожные пробы при исследовании на туберкулез КРС. Все доступные вакцины сейчас являются цельноклеточными.

Руководства по производству ветеринарных вакцин приводятся в Главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, приведенные здесь и в Главе 1.1.8, являются по своей природе общими, и могут быть дополнены национальными и региональными руководствами.

2. Описание производства и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристики посевного материала

2.1.1. Критерии качества

Исследования на чистоту должны проводиться на посевных культурах и итоговых клетках посредством окрашивания мазков.

2.1.2. Валидация в качестве вакцинного штамма

Посевные штаммы должны быть доминирующего типа, которые можно проверить с использованием биотипирования или генетического анализа. Они должны быть безвредными при введении рекомендуемым способом вакцинации соответствующим видам целевых животных.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

Для производства вакцин организмы можно выращивать на жидкой синтетической среде, такой как синтетическая среда Reid. Организмы растут в виде плёнки на поверхности жидкости. С целью обеспечения хорошей площади поверхности удобно использовать такие сосуды, как конические колбы, содержащие жидкую среду на одну треть их номинального объёма. Эти колбы можно засеивать непосредственно с картофельных скошенных культур, но при использовании некоторых штаммов могут потребоваться один или несколько пассажей на жидкой среде для обеспечения адекватного роста плёнки для окончательного серийного пассажа. Такое пассирование должно проводиться с 2-недельными интервалами, так как более длительные периоды могут привести к перезреванию и опусканию плёнки. Инкубацию следует проводить при 37°C.

Чтобы приготовить вакцину, плёнку, выращенную из 2-недельных культур каждого штамма, следует отделить от жидкой среды путём декантирования, фильтрации и сдавливания между двумя прокладками из фильтровальной бумаги. Влажную культуру *MAP* смешивают с адьювантом, таким как жидкий парафин, оливковое масло и пемза.

2.2.2. Контроль в процессе производства

Необходимо проверять адекватный рост культуры и чистоту культуры. Присутствие контаминирующих организмов можно обнаруживать с помощью традиционного тестирования урожаев на стерильность. Исследования на наличие патогенных микобактерий проводят путём введения влажной культуры, взятой до смешивания с адьювантом и десятикратно разведённой соевым раствором, двум морским свинкам по 1 мл каждой. За этими морскими свинками в течение 8 недель проводят наблюдение, убивают гуманным способом и исследуют на наличие аномальных поражений.

2.2.3. Исследование партий готового продукта

i) Стерильность

Исследования биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации можно найти в Главе I.1.5. В традиционных тестах на стерильность вакцинный организм обычно не растёт до поддающегося обнаружению уровня.

ii) Идентичность

Идентичность культуры проверяют окрашиванием по Цилю-Нильсену и ПЦР (см. Раздел В.1.4.)

iii) Безопасность

Эти тесты обычно проводят на лабораторных животных, хотя удовлетворительными могут быть также тесты с использованием большого количества доз на целевых животных. Типичный тест на лабораторных животных будет следующим. Каждую из двух морских свинок прививают подкожно приемлемой серией вакцины и частью дозы для КРС, установленной заранее, чтобы она давала узелок, но не явный некроз на месте инъекции. За животными наблюдают в течение 8 недель, убивают гуманным способом и исследуют на наличие аномальных поражений.

iv) Иммуногенность партии

Так как тесты на защитные антитела оказались непрактичными, то можно использовать тест на способность к сенсибилизации. Он может затем соотноситься с содержанием бактерий на основе веса. Типичный тест будет следующим: морских свинок сенсибилизируют внутримышечным введением 0,5 мл 100-кратного разведения в жидком парафине вакцины, которую необходимо протестировать. Кожные пробы проводят через 6 недель после повышения чувствительности путём интрадермального введения 0,2 мл, по меньшей мере, трёх серийных разведений антигена *MAP*, такого как джонин, очищенный белковый продукт, причём, разведения подбираются таким образом, чтобы ожидаемые кожные реакции были диаметром от 8 мм до 25 мм. Каждая морская свинка получает несколько разведений на один бок, их распределение осуществляют методом латинских квадратов. Через 24 – 48 часов измеряют кожные реакции. Эталонный препарат для проб данного типа ещё пока полностью не установлен. Очищенный белковый продукт птичьего туберкулина с известным международным словесным определением единицы измерения может использоваться как кожный опытный

антиген в тестах данного типа с целью обеспечения гарантии того, что вакцина способна продуцировать адекватное повышение чувствительности (соответствующее вакцинации).

2.3. Требования к авторизации/регистрации/лицензированию

2.3.1. Процесс производства

Обычно консервант включают в состав вакцины в многодозовых контейнерах.

2.3.2. Требования к безопасности

- i) Безопасность для целевых и нецелевых животных
См. Раздел С1.2.2.3.
- ii) Возврат к вирулентности для аттенуированных/живых вакцин и аспекты окружающей среды
Живые вакцины отсутствуют.
- iii) Меры предосторожности (опасности)
Вакцины вызывает некоторые побочные эффекты, образование узелков и чувствительность животных к туберкулиновой пробе (Gwozdz *et al.*, 2000). У людей случайное введение вакцины приводило к хроническим воспалительным реакциям, требующим хирургического вмешательства.

2.3.3. Требования к эффективности

Вакцина должна применяться как часть контрольной программы и сама по себе не будет предоставлять защиту против болезни, вызываемой *MAR*.

2.3.4. Вакцины, позволяющие осуществлять стратегию DIVA (выявление инфекции у вакцинированных животных)

На данный момент вакцина DIVA отсутствует.

2.3.5. Длительность иммунитета

После вакцинации в возрасте 14 – 30 дней, действие вакцинации выражается как сокращение уровня выделения среди вакцинированных животных по сравнению с невакцинированными КРС.

С2. Джонин

1. Справка

Очищенный белковый продукт джонин является препаратом термически обработанных продуктов роста и лизиса *MAR*. Очищенный белковый продукт птичьего туберкулина является препаратом термически обработанных продуктов роста и лизиса *M. a. avium* D4ER или ТВ 56. Подробная информация по очищенному белковому продукту птичьего туберкулина приведена в Главе 2.3.6. Туберкулез птиц. Эти два препарата используются посредством подкожного введения с целью обнаружения гиперчувствительности замедленного типа как способа определения животных, инфицированных или сенсибилизированных *MAR*.

Руководства по производству ветеринарных вакцин приводятся в Главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, приведенные здесь и

в Главе 1.1.8, являются по своей природе общими, и могут быть дополнены национальными и региональными руководствами.

2. Описание производства и минимальные требования к джонину

2.1. Характеристики посевного материала

2.1.1. Критерии качества

Культуры следует проверять с использованием метода окрашивания мазков на присутствие контаминирующих организмов.

В целях проверки отсутствия эффекта повышения чувствительности, каждой из трёх морских свинок, ранее не обработанных каким-либо материалом, который мог бы помешать проведению теста, вводили трижды интрадермальным способом с интервалом в 5 дней 0,01 мг тестируемого препарата в объёме 0,1 мл. Через 15 – 21 день после третьей инъекции каждой морской свинке, вместе с тремя контрольными морскими свинками, которым предварительно инъекции не делали, вводили интрадермально ту же самую дозу того же самого джонина. Реакции у двух групп морских свинок не должны значительно отличаться спустя 24 – 48 часов.

2.1.2. Валидация в качестве штамма

Штаммы *MAP*, используемые для приготовления посевных культур, должны быть идентифицированы посредством биотипирования или генетического анализа. Должно быть продемонстрировано, что они свободны от контаминирующих организмов.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

Джонин для проведения кожной пробы представляет из себя очищенный белковый дериват, приготовленный из одного или более штаммов *MAP*. Его можно приготовить следующим образом.

Штаммы *MAP* выращивают в виде плёнки на жидкой среде Reid. Производственные культуры обычно инокулируются из жидких посевных культур, а не непосредственно из посевного материала на твёрдой среде (синтетическая среда Reid). Производственные культуры инкубируют при 37°C в течение 10 недель.

В конце инкубационного периода культуральная среда имеет рН около 5 и, если перед обработкой паром не повысить значение рН до 7,3 с использованием гидроокиси натрия, можно получить небольшое количество джонина или вовсе не получить его. После тщательного перемешивания культуры в течение 3 часов обильно обрабатывают паром. Весь объём убитых организмов выводят с использованием грубой фильтрации и фильтрат осветляют последующей фильтрацией. Протеин в фильтрате преципитируют химическим способом с помощью 40% трихлоруксусной кислоты, отмывают и снова растворяют (щелочной растворитель). Продукт стерилизуют фильтрацией. Можно добавить antimicrobial консервант, который не приводит к ложноположительным реакциям, такой как фенол (но не более 0,5% [в/о]). Глицерин (не более 10% [в/о]) можно добавлять в качестве стабилизатора. Продукт распределяют в асептических условиях по стерильным стеклянным контейнерам, которые затем герметично закрывают.

2.2.2. Контроль в процессе производства

После окончательной фильтрации проверяют стерильность раствора очищенного белкового деривата.

Стерильные фильтраты тестируют на содержание белка методом Kjeldahl (Британская ветеринарная фармакопея, 1985). Содержание белка в конечном продукте доводят до 0,475-0,525 мг/мл. Показатель pH должен быть в диапазоне 6,5-7,5.

2.2.3. Исследование партий готового продукта

i) Стерильность
Исследования биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации можно найти в Главе I.1.5. В традиционных тестах на стерильность вакцинный организм обычно не растёт до поддающегося обнаружению уровня.

ii) Идентичность
Идентичность культуры проверяют окрашиванием по Цилю-Нильсену и ПЦР (см. Раздел В.1.4.)

iii) Безопасность
Каждой из двух морских свинок вводят подкожно 0,5 мл тестируемого джонина. В течение 7 дней не должно быть существенных местных или системных поражений (Британская ветеринарная фармакопея, 1985).

Тесты по определению влияния джонина на живых бактерий могут проводиться или на материале до того, как он будет распределён по конечным контейнерам, или на образцах, взятых непосредственно из конечных контейнеров. Следует отбирать образец объёмом, по меньшей мере, 10 мл и вводить его внутрибрюшинно или подкожно, по крайней мере, двум морским свинкам, поделив тестируемый объём равным образом между двумя свинками. Желательно брать более крупный образец, скажем 50 мл, и концентрировать остаточные микобактерии центрифугированием или мембранной фильтрацией. За морскими свинками наблюдают, по меньшей мере, в течение 42 дней, а затем проводят аутопсические исследования. Любые макроскопические поражения изучают с помощью микроскопа и культивирования.

iv) Иммуногенность партии
Иммуногенность джонина в настоящее время определяют с помощью химического анализа белка с использованием метода Kjeldahl. В соответствии с рекомендацией содержание очищенного белкового деривата должно составлять $0,5 \pm 0,025$ мг/мл в конечном продукте (Британская ветеринарная фармакопея, 1985).

2.3. Требования к авторизации/регистрации/лицензированию

Для джонина используемый фенол должен составлять не более 0,5% (в/о). Концентрацию консерванта в конечном продукте и его персистентность следует проверять в течение всего срока хранения

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основные публикации перечислены в этом списке. Если Вы заинтересованы у других публикациях, пожалуйста, обратитесь к экспертам МЭБ.

BRITISH PHARMACOPOEIA (VETERINARY) (1985). Johnin purified protein derivative. British Pharmacopoeia (Veterinary), 184–185.

COLLINS M.T., KENEFICK K.B., SOCKETT D.C., LAMBRECHT R.S., MCDONALD J. & JORGENSEN J.B. (1990). Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 2514–2519.

COX J.C., DRANE D.P., JONES S.L., RIDGE R. & MILNER A.R. (1991). Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.*, 68, 157–160.

EAMENS G.J., WHITTINGTON R.J., MARSH I.B., TURNER M.J., SAUNDERS V., KEMSLEY P.D. & RAYWARD D. (2000). Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet. Microbiol.*, 77 (3–4), 357–367.

ELLINGSON J.L.E., BOLIN C.A. & STABEL J.R. (1998). Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol. Cell. Probes*, 12, 133–142.

FODSTAD F.H. & GUNNARSSON E. (1979). Post-mortem examination in the diagnosis of Johne's disease in goats. *Acta Vet. Scand.*, 20 (2), 157–167.

GREIG A., STEVENSON K., HENDERSON D., PEREZ V., HUGUES V., PAVLIK I., HINES M.E. 2ND, MCKENDRICK I. & SHARP J.M. (1999). Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1746–1751.

GWOZDZ J.M., THOMPSON K.G., MURRAY A., REICHEL M.P., MANKTELOW B.W. & WEST D.M. (2000). Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust. Vet. J.*, 78 (11), 779–783.

HENDRICK S., DUFFIELD T., LESLIE K., LISSEMORE K., ARCHAMBAULT M. & KELTON D. (2005) The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds in Ontario. *Can. Vet. J.*, 46 (12), 1126–1129.

HOPE A.F., KLUVER P.F., JONES S.L. & CONDRON R.J. (2000). Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.*, 78 (12), 850–856.

JUBB T.F., SERGEANT E.S., CALLINAN A.P. & GALVIN J. (2004). Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust. Vet. J.*, 82 (9), 569–573.

KALIS C.H., COLLINS M.T., HESSELINK J.W. & BARKEMA HW. (2003). Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet. Microbiol.*, 97 (1–2), 73–86.

- KOH S.H., DOBSON K.Y. & TOMASOVIC A. (1988). A Johne's disease survey and comparison of diagnostic tests. *Austr. Vet. J.*, 65, 160–161.
- LARSON A.B. & KOPECKY K.E. (1970). *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *Am. J. Vet. Res.*, 31, 255–258.
- LEITE F.L., STOKES K.D., ROBBE-AUSTERMAN S. & STABEL J.R. (2013). Comparison of fecal DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 25, 27–34.
- MCFADDEN J.J., BUTCHER P.D., CHIODINI R. & HERMON-TAYLOR J. (1987). Crohn's disease – isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 796–801.
- MERKAL R.S., LARSEN A.B., KOPECKY K.E. & NESS R.D. (1968). Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 29, 1533–1538.
- MILNER A.R., MACK W.N., COATES K., WOOD P.R., SHELDRIK P., HILL J. & GILL I. (1988). The absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. In: *Johne's Disease*, Milner A. & Wood P., eds. CSIRO Publications, Melbourne, Australia, 158–163.
- NIELSEN S.S. & TOFT N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet. Microbiol.*, 129, 217–235.
- PARKA K.T., ALLENB A.J. & DAVIS W.C. (2014). Development of a novel DNA extraction method for identification and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from tissue samples by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods*, 99, 58–65.
- SALGADO M., MANNING E.J. & COLLINS M.T. (2005). Performance of a Johne's disease enzyme-linked immunosorbent assay adapted for milk samples from goats. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 17 (4), 350–354.
- SERGEANT E.S., MARSHALL D.J., EAMENS G.J., KEARNS C. & WHITTINGTON R.J. (2003). Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.*, 61 (4), 235–248.
- SEVILLA I., SINGH S.V., GARRIDO J.M., ADURIZ G., RODRIGUEZ S., GEJO M.V., WHITTINGTON R.J., SAUNDERS V., WHITLOCK R.H. & JUSTE R.A. (2005). Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24 (3), 1061–1066.
- SOCKETT D.C., CONRAD T.A., THOMAS C.D. & COLLINS M.T. (1992). Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 1134–1139.
- STABEL J.R. & BANNANTINE J.P. (2005). Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.*, 43 (9), 4744–4750.

STROMMINGER B., STEVENSON K. & GERLACH G.F. (2001). Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 196 (1), 31–37.

SWEENEY R.W., WHITLOCK R.H., BUCKLEY C.L. & SPENCER P.A. (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7, 488–493.

THOREL M.F., KRICHEVSKY M. & VINCENT LEVY-FREBAULT V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40, 254–260.

VANSNICK E., DE RIJK P., VERCAMMEN F., GEYSEN D., RIGOUTS L. & PORTAELS F. (2004). Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Vet. Microbiol.*, 100 (3–4), 197–204.

WHITLOCK R.H., ROSENBERGER A.E., SWEENEY R.W., HUTCHINSON L.J. (1991). Culture techniques and media constituents for the isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Providence, USA*, 94–111.

WHITLOCK R.H., WELLS S.J., SWEENEY R.W. & TIEM J. VAN (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.*, 77, 387–398.

WHITTINGTON R., MARSH I., CHOY E., COUSINS D. (1998). Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol. Cell Probes.*, 12 (6), 349–358.

WHITTINGTON R.J., MARSH I., MCALLISTER S., TURNER M.J., MARSHALL D.J. & FRASER C.A. (1999). Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (4), 1077–1083.

YOKOMIZO Y., MERKAL R.S. & LYLE P.A.S. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, 44, 2205–2207.

YOKOMIZO Y., YUGI H. & MERKAL R.S. (1985). A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jpn J. Vet. Sci.*, 47, 111–119.

*

**

NB: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по паратуберкулезу (См. Таблицу Части 4 этого *Руководства по наземным животным* или см. сайт МЭБ, чтобы получить самый последний список <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> <http://www.oie.int/>).

Свяжитесь со Справочными лабораториями МЭБ для получения дополнительной информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам против паратуберкулеза.