

Глава 3.4.6.

ТУБЕРКУЛЕЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

РЕЗЮМЕ

*Туберкулез КРС – хроническая болезнь животных и людей, возбудителем которой являются бактерии *Mycobacterium bovis*. Во многих странах туберкулез КРС является основным инфекционным заболеванием крупного рогатого скота, других домашних животных и некоторых диких животных. Возможность передачи болезни людям является проблемой, которую необходимо решать на уровне системы национального здравоохранения.*

*Наиболее частым способом заражения считается заражение КРС бактериями *M. bovis* воздушно-капельным путем, но заражение случается также при потреблении в пищу контаминированного материала. После заражения могут появиться невазкулярные узелковые гранулемы, известные как туберкулезные гранулемы. Чаще всего поражаются легкие, ретрофаренгиальные, бронхиальные и медиастинальные лимфатические узлы. Поражения можно также наблюдать в мезентериальных лимфатических узлах, в печени, селезенке или на серозных оболочках, а также в других органах.*

Диагностируют туберкулез КРС обычно у живых животных на основании реакций гиперчувствительности замедленного типа. Инфекция часто бывает субклинической, т.е. в случае наличия инфекции, нет ярко выраженных клинических признаков болезни, к которым относятся: слабость, отказ от корма, истощение, диспноэ, увеличение лимфатических узлов и кашель (особенно на поздних стадиях туберкулеза). После смерти проводят диагностическое патологоанатомическое исследование, используя также гистопатологические и бактериологические методы. Можно также использовать экспресс методы выделения нуклеиновых кислот, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Однако эти методы достаточно трудоемкие, и их следует использовать только в случае их надлежащей валидации. Традиционное культивирование микобактерий остается золотым стандартом для рутинного подтверждения инфекции.

Идентификация возбудителя: Бактериологические исследования заключаются в выявлении кислотоустойчивых бацилл при микроскопическом исследовании (что обеспечивает предварительное подтверждение). Подтверждают заражение выделением микобактерий на селективных культуральных средах с последующей идентификацией с помощью культуральных и биохимических тестов или ДНК-методик, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Прививание животных, использовавшееся ранее для подтверждения заражения *Mycobacterium bovis*, теперь используется редко по причинам необходимости выполнения требований к обеспечению благополучия животных.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа: Эта реакция является стандартным методом обнаружения туберкулеза КРС. При проведении этого теста измеряют толщину кожи, в измеренный участок внутрикожно вводят туберкулин для КРС, затем через 72 часа измеряют любое последующее набухание на участке инъекции. Сравнительная внутрикожная проба с туберкулином для птиц и КРС обычно используется для того, чтобы провести дифференциацию между животными, инфицированными *M. Bovis*, и теми животными, которые являются чувствительными к туберкулину из-за воздействия других микобактерий или родственных бактерий. Решение об использовании однократного теста или сравнительного теста обычно зависит от превалентности инфекции туберкулеза и от уровня воздействия других сенсибилизирующих организмов, находящихся в окружающей среде. В силу своей более высокой специфичности и более легкой стандартизации продукты очищенного белкового деривата (ППД) заменили туберкулины, термоконцентрированные в синтетической среде. Рекомендуемая доза ППД для КРС составляет минимум 2000 международных единиц (МЕ), а в сравнительной туберкулиновой пробе дозы должны быть не ниже 2000 МЕ каждая. Результаты интерпретируют на основе используемой тест-методики.

Лабораторные анализы крови: В настоящее время доступны новые диагностические анализы крови, например, анализ высвобождения гамма-интерферона, при котором твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) используется в качестве метода выявления интерферона, реакция пролиферации лимфоцитов, которая выявляет клеточные иммунные реакции, и непрямой ИФА, который выявляет гуморальную иммунную реакцию. Материально-техническое обслуживание и лабораторное выполнение некоторых из этих тестов может быть ограничивающим фактором. Анализы, для проведения которых используется кровь, могут иметь ряд преимуществ, особенно если речь идет о трудноизлечимых животных, о животных в зоопарке и дикой

природе, хотя интерпретация результатов может затрудняться из-за отсутствия данных о некоторых видах. Последняя информация об использовании различных диагностических тестов для прочих видов животных (кроме КРС), представлена в недавнем обзоре Cousins & Florisson (2005).

Требования, предъявляемые к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам: Ведется разработка вакцин и оценка их использования для КРС и диких животных, но в настоящее время их не используют на регулярной основе, поскольку они могут помешать проведению туберкулиновых кожных проб и других иммунологических тестов для выявления зараженных животных. Существуют стандартные методы производства очищенных туберкулинов ППД для КРС. ППД, который используют для проведения указанных тестов, должен быть получен в соответствии с требованиями ВОЗ; должен соответствовать требованиям к исходным материалам, методам производства и мерам предосторожности, требованиям к добавляемым веществам; должен быть свободен от контаминации, должен соответствовать требованиям к идентичности, надежности, иммуногенности, специфичности; должен быть свободен от эффекта сенсibilизации. Биологические анализы по определению биологической активности имеют особое значение, и иммуногенность должна выражаться в международных единицах.

А. ВВЕДЕНИЕ

Mycobacterium bovis – зоонозный организм, который относится к организмам III группы риска и требует всех необходимых мер предосторожности для предотвращения заражения человека. Туберкулез КРС - инфекционная болезнь, возбудителем которой является бактерия *M. Bovis*, поражающая КРС, других одомашненных животных и некоторых диких животных (свободных или содержащихся в зоопарке). Болезнь характеризуется формированием узелковых гранулём, известных как туберкулезные гранулёмы. Несмотря на то, что обычно туберкулезу КРС дают характеристику хронически протекающей ослабляющей болезни, иногда она проявляется в виде стремительно протекающей прогрессирующей болезни. Поражения могут быть обнаружены в любых тканях, но чаще всего они затрагивают лимфатические узлы (особенно головы и грудной клетки), легкие, кишечник, печень, селезенку, плевру и брюшную полость.

Следует заметить, что другие члены комплекса *M.tuberculosis*, которых ранее относили к *M.bovis*, были в итоге приняты в качестве новых видов, несмотря на идентичные

последовательности 16s РНК и более 99% идентичность их геномных последовательностей. К ним относятся *M. caprae* (Aranaz et al., 2003) (в некоторых странах считается основным патогеном коз) и *M. pinnipedii* (Cousins et al., 2003), патоген морских котиков и морских львов. Эти два вида являются зоонозными. В центральной Европе *M. caprae* признан в качестве типичной причины туберкулёза КРС (Prodinger et al., 2005). По сути болезнь, вызываемая *M. caprae*, существенно не отличается от той, что вызвана *M. bovis*. Кроме того, для ее диагностики можно воспользоваться теми же тестами. В странах, в которых реализуют программы по искоренению туберкулеза, клинические признаки туберкулеза КРС встречаются редко, потому что внутрикожная туберкулиновая проба позволяет поставить предварительный диагноз и устранить инфицированных животных до появления признаков. Однако до начала реализации национальных кампаний по искоренению туберкулеза симптомы болезни можно было наблюдать довольно часто (Cousins et al., 2001).

Во многих случаях болезнь протекает в хронической форме и симптомы могут отсутствовать даже на поздних стадиях, когда уже поражены многие органы. Если же клинические симптомы есть, то они варьируются. О поражении легких может свидетельствовать кашель, вызванный изменениями температуры или пальцевым прижатием в области трахеи. Диспноэ и другие признаки ранних стадий пневмонии также являются свидетельством поражения легких. В более тяжелых случаях часто сильно увеличены лимфатические узлы, что препятствует прохождению воздуха, создает препятствия в пищеварительном тракте, закупоривает кровеносные сосуды. Лимфатические узлы на голове и шее могут стать заметными, иногда они прорываются и сочатся. В некоторых случаях поражение пищеварительного тракта проявляется периодической диареей и запорами. На последних стадиях можно наблюдать истощение и острую дыхательную недостаточность. Можно наблюдать поражения половых органов у особей женского пола. Поражения гениталий у особей мужского пола наблюдаются редко.

Туберкулезные гранулемы чаще всего обнаруживают при аутопсии в бронхиальных, медиастинальных, ретрофарингеальных и портальных лимфатических узлах, которые могут являться единственной пораженной тканью. Кроме того, часты поражения в легких, печени, селезенке, и на поверхностях полостей тела. При пальпации можно часто обнаружить ранние узелковые поражения легких. Поражения обычно не издаются запахами. Поражения могут быть обнаружены и в других анатомических структурах, поэтому необходим осмотр с целью их выявления.

При макроскопическом обследовании можно увидеть, что туберкулёзная гранулема имеет желтоватый вид, а по консистенции может быть творожистой, творожисто-кальцифицированной или обызвествленной. Иногда появление гранул может сопровождаться гнойными выделениями. У оленых и верблюдовых гнойные выделения могут быть обильней. Некоторые нетуберкулезные гранулемы иногда неотличимы при макроскопическом обследовании от туберкулезных. Творожистый центр обычно сухой, твердый и покрыт фиброзной соединительной оболочкой разной толщины. Размер поражений варьируется от самых маленьких, которые невозможно обнаружить невооруженным глазом, до поражений, охватывающих обширные части органов. Для обнаружения мелких поражений в тканях может потребоваться серийное рассечение органов и тканей. С точки зрения гистологии поражения, вызванные *M.bovis*, часто характеризуются олигобациллярностью (наличием малого количества организмов), а отсутствие кислотоустойчивых организмов не исключает туберкулез при воспалении лимфатических узлов неизвестной этиологии. При обнаружении у оленых и некоторых экзотических видов тонкостенных гнойных абсцессов в отсутствие специфической этиологии также следует подозревать туберкулез.

Бактерии *Mycobacterium bovis* были выявлены у человека в большинстве стран, где изоляты микобактерий от людей были полностью охарактеризованы. Инцидентность легочного туберкулеза, вызванного *M.bovis*, выше среди работников ферм и на бойнях, чем среди городских жителей. Возможность передачи *M.bovis* человеку через молоко и молочные продукты исключается при пастеризации молока. Одним из результатов программ по искоренению туберкулеза было сокращение количества случаев заболевания и смертельных случаев, вызванных туберкулезом КРС среди людей.

Несмотря на то, что истинными хозяевами *M. bovis* считается КРС, есть зарегистрированные случаи заболевания среди многих одомашненных и неодомашненных животных. Возбудителя выделяли у буйволов, бизонов, овец, коз, лошадей, верблюдов, свиней, кабанов, оленей, антилоп, собак, кошек, лис, норок, барсуков, африканских хорьков, крыс, приматов, лам, лесных антилоп, канн, тапиров, лосей, слонов, антилоп наконг, сернобыков, антилоп мендес, носорогов, поссумов, сусликов, выдр, тюленей, зайцев, кротов, енотов, койотов, и некоторых хищников семейства кошачьих, включая львов, тигров, леопардов и рысей (De Lisle et al., 2001; O'Reilly & Daborn, 1995).

О случаях туберкулеза в дикой природе впервые стало известно в 1929 году, когда болезнь обнаружили в Южной Африке у большого куду (*Tragelaphus strepsiceros*) и антилопы - дукера (*Sylvicapra grimmii*) и к 1940-м годам болезнь уже стала эндемичной для больших куду. В 1982 году в Уганде была обнаружена превалентность 10% среди африканских буйволов и 9% среди африканских кабанов (*Phacochoerus aethiopicus*). В Замбии сообщали о случаях заражения *M.bovis* среди личи (*Kobus leche kafuensis*) и о заражении антилопы канна (*Traurotragus oryx*). О вспышке туберкулеза среди зеленых павианов анубисов (*Papio cynocephalus anubis*) сообщалось из Кении. Диагноз заражения *Mycobacterium bovis* также был поставлен африканскому буйволу в национальном парке Kruger Южной Африки (Bengis et al., 1996), совсем недавно инфекция распространилась на другие виды, такие как павиан чакма (*Papio ursinus*), лев (*Panthera leo*), и гепард (*Acynonyx jubatus*), а также вновь проявилась у большого куду.

Активное применение методики туберкулиновых проб и отбраковка животных с положительной реакцией позволило устранить *M.bovis* в популяциях КРС на фермах в некоторых странах, но повсеместно данная стратегия не была успешной. Обширные исследования спорадичного повторного возникновения *M.bovis* показали, что в некоторых странах существуют резервуары инфекции в дикой природе, и они могут быть источниками инфекции для КРС, оленей и других сельскохозяйственных животных. Риск того, что указанные резервуары представляют опасность для домашних животных и людей, варьируется в зависимости от специфической эпизоотологической ситуации для конкретных видов и окружающей среды (Corner et al., 2006; Morris et al., 1994).

Обнаружение инфекции в популяциях диких животных требует проведения бактериологического расследования или использования валидированного метода тестирования для поражаемых видов (туберкулиновая проба не является эффективной для всех видов) наряду с эпидемиологическим анализом информации. Было выявлено, что барсук (*Meles meles*) в Соединенном Королевстве (Wilesmith, 1991) и в Республике Ирландия (O'Reilly & Daborn, 1995), дикие кабаны (*Sus scrofa*) (Испания) (Naranjo et al., 2008), щеткохвостовые посумы (*Trichosurus vulpecula*) (Новая Зеландия) (Подразделение по охране здоровья животных, 1986) и некоторые другие дикие виды в Африке могут быть пассивными переносчиками инфекции *M.bovis*. Контроль передачи инфекции от дикой популяции к популяции животных, содержащимся на фермах, является комплексным, и до настоящего момента он основывался на искоренении инфицированной популяции в дикой

природе. В некоторых странах изучается возможность использования вакцинации с целью контроля болезни среди некоторых видов.

Бактерии *Mycobacterium bovis* были выделены у оленей, живущих на фермах, и свободно обитающих оленей. Болезнь может быть подострой, или хронической с переменной скоростью прогрессирования. Небольшое количество животных может подвергнуться тяжелому заражению за несколько месяцев, в то время как у других клинические признаки, связанные с поражениями, появятся через несколько лет. Появившиеся поражения могут напоминать те, которые обнаруживают у КРС (гранулематозное воспаление с творожистыми выделениями). Поражения могут принимать форму тонкостенных абсцессов с небольшой кальцификацией и гнойным материалом. Тонкостенные абсцессы наблюдали, в том числе, и у лам. Следует подозревать туберкулез у оленей в случае наличия у них гнойниковых поражений неизвестной этиологии. Обычно поражения затрагивают лимфатические узлы, располагающиеся на голове и груди. Поражения могут затронуть мезентериальные лимфатические узлы – на этом участке наблюдаются гнойники большого размера. Расположение поражений зависит от инфицирующей дозы, способа заражения и инкубационного периода до исследования. Туберкулиновую пробу можно ставить на оленях, выращиваемых на фермах. Проба проводится на боковой части шеи. Для получения достоверных результатов необходимо состричь шерсть на месте введения пробы, аккуратно провести внутрикожную инъекцию туберкулина и точно измерить толщину кожи на месте внутрикожной туберкулиновой пробы до и после инокуляции, используя для замеров штангенциркуль (Clifton-Hadley & Wilesmith, 1991).

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Если диагностические методики используются в рамках официальной программы по контролю и искоренению туберкулеза, то компетентному органу в области ветеринарии рекомендовано:

- Утвердить диагностические тесты (тест);
- Уполномочить лабораторию, проводящую данное тестирование; и
- Выдать разрешением тем специалистам, которые применяют указанные диагностические методики на животных, а именно кожные пробы.

1. Идентификация возбудителя

У КРС, как правило, клинические признаки туберкулеза не проявляются до появления обширных поражений. По этой причине, диагностика туберкулеза у отдельных животных и реализация программ по искоренению не представлялись возможными до того момента, пока Кох не получил туберкулин в 1890 году. Туберкулин, концентрированный стерильный культуральный фильтрат туберкулезной палочки, выращенный на глицериновом мясном бульоне, а в последнее время, на синтетической среде, представляет собой средство обнаружения болезни. Поскольку кожные пробы иногда имеют практические недостатки, то в попытке разработать усовершенствованные или альтернативные диагностические методы проводили изучение иммунологических ответов на заражение КРС *M. bovis*. Для диагностика туберкулеза у КРС и других животных (например, коз, буйволов) все чаще используется диагностический тест крови на выявление гамма-интерферона, данный тест имеется в продаже. Свою пригодность в качестве дополнительных (усиление специфичности) и параллельных тестов (усиление чувствительности) продемонстрировали тест пролиферации лимфоцитов и твердофазный иммуноферментный анализ ИФА для определения IgG₁, (применяется в отношении разводимых на ферме благородных оленей).

Присутствие *M. bovis* в клинических образцах, и образцах, взятых после смерти, можно выявить при исследовании окрашенных мазков или тканевых срезов и подтвердить при культивировании организма на среде для первичного выделения. Контейнеры для сбора образцов должны быть чистыми, предпочтительно стерильными (использование контейнеров для образцов, контаминированных микобактериями из окружающей среды, может помешать идентификации инфекции *M. bovis* по причине быстрого роста микобактерий из окружающей среды); по возможности, необходимо использовать одноразовые, пластиковые контейнеры вместимостью 50 мл. Они подходят для различных типов образцов. Образцы, которые подлежат отправке в лабораторию, необходимо уложить на подушку и закупорить во избежание утечки, а также упаковывать надлежащим образом, чтобы не допустить повреждений при перевозке. При поставке образцов, которые могут включать возбудителей зоонозных болезней, следует соблюдать правила перевозки опасных грузов Международной ассоциации воздушного транспорта (ИАТА), Регламенты по работе с опасными грузами (DGR). Требования кратко изложены в Главе 1. 1.2. *Сбор, доставка и хранение диагностических образцов* и Главе 1.1.3. *Транспортировка образцов животного происхождения*. Своевременная доставка образцов в лабораторию увеличивает вероятность выделения культуры *M. bovis*, однако, если ожидаются задержки при поставке, образцы необходимо охладить или заморозить с целью сдерживания роста контаминантов и сохранения микобактерий. В теплых условиях,

когда невозможна заморозка, можно добавить борную кислоту (конечная концентрация 0,5 % [в / о]) в качестве бактериостатического агента, но только для ограниченного периода времени, не дольше одной недели. Необходимо соблюдать меры предосторожности, чтобы избежать заражения персонала лаборатории (смотрите Главу 1.1.4. *Биобезопасность и биозащита: Стандарт работы с материалами биологического риска в ветеринарной лаборатории и в виварии*). Все процедуры, в которых используют культуры, необходимо проводить в ламинарном боксе с биологической защитой.

1.1. Микроскопическое исследование

Mycobacterium bovis можно выявить под микроскопом на прямых мазках от клинических образцов, а также на приготовленных тканевых материалах. Кислотоустойчивость *M. bovis*, как правило, выявляют при помощи классического красителя Ziehl-Neelsen, но также можно использовать флуоресцентный кислотоустойчивый краситель. Удовлетворительные результаты также можно получить при использовании иммунопероксидазного метода. Предположительный диагноз микобактериоза можно поставить в том случае, если в тканях имеются характерные гистологические поражения (творожистый некроз, минерализация, эпителиоидные клетки, многоядерные гигантские клетки и макрофаги).

Поскольку поражения часто отличаются олигобациллярностью, то наличие кислотоустойчивых организмов в гистологических срезах можно и не выявить, несмотря на то, что *M. bovis* может быть выделен в культуре. Однако большое количество кислотоустойчивых организмов наблюдают в поражениях у приматов, кошачьих, куньих (барсуки) и сумчатых (щеткохвостые поссумы).

1.2. Культивирование

С целью обработки образцов для культивирования, в первую очередь образцы гомогенизируют с помощью пестика и ступки, гомогенизатора или мешалки, далее деконтаминируют либо детергентом (например, 0,375-0,75% гексадецилпиридиний хлорид [НРС]), либо щелочью (2-4% гидроксид натрия) или кислотой (5% щавелевая кислота). Смесь (щелочную или кислотную) встряхивают в течение 10-15 минут при комнатной температуре, затем нейтрализуют. При использовании НРС нейтрализация не требуется. Суспензию центрифугируют, супернатант отбраковывают, а осадок используют для культивирования и исследования под микроскопом. Рекомендуется в

качестве обязательного минимума культивировать собранные в пулы пробы лимфатических узлов головы и грудной клетки, когда видимых поражений не выявлено у животных, продемонстрировавших по результатам аутопсии положительные реакции в тестах на туберкулин или интерферон.

Для первичного выделения, осадок обычно засевают на набор твердых яичных сред, таких как Lowenstein-Jensen, Coletsos или Stonebrinks, эти среды должны содержать либо пируват, либо глицерин и пируват. Также следует использовать агаровую среду, например, среду Middlebrook 7H10 или 7H11 или агаровую среду на основе крови (Cousins et al., 1989).

Культуры инкубируют в течение минимум 8 недель (предпочтительно 10-12 недель) при температуре 37⁰С с СО₂ или без него. Среда должна находиться в плотно закрытых пробирках, чтобы предотвратить высыхание. Скошенные среды исследуют на макроскопический рост в интервалах во время периода инкубации. Когда рост становится заметным, готовят мазки и окрашивают их методом Ziehl-Neelsen. Рост *M. bovis* заметен обычно после 3 – 6 недель инкубации в зависимости от используемой среды.

В некоторых больницах и ветеринарных лабораториях в повседневной практике используют системы жидких культур; в этих системах рост измеряют с помощью радиометрических или флуориметрических средств.

Если обнаруживают признаки сильной контаминации, то процесс культивирования следует повторить, используя сохранённые инокуляты с альтернативным деконтаминирующим агентом. Фактором, ограничивающим возможность выделения, часто выступает низкое качество представленных проб, поэтому необходимо приложить все усилия, чтобы лаборатория получила пробы надлежащего качества.

На основе характерных паттернов роста и колониальной морфологии можно провести предварительную диагностику *M. bovis*; однако, для каждого изолята необходимо подтверждение. Необходимо четко отличать *M. bovis* от других членов «туберкулезного комплекса», а именно от *M. tuberculosis* (первичная причина туберкулеза у людей), *M. africanum* (занимает промежуточное фенотипическое положение между *M. tuberculosis* и *M. bovis*), *M. microti* (бацилла мышей полевков, редко встречающийся организм), *M. pinnipedii* и *M. caprae*.

Mycobacterium tuberculosis может заразить КРС и сделать его восприимчивым к туберкулину для КРС без появления каких-либо типичных поражений. Иногда у КРС из поражений, напоминающих поражения при туберкулезе, можно выделить *M. avium* или другие микобактерии окружающей среды. В таком случае необходима тщательная идентификация, чтобы исключить смешанное заражение *M. bovis*.

Идентификацию изолятов обычно проводят посредством определения традиционных культуральных и биохимических свойств. На подходящей твердой среде, основанной на пирувате, колонии *M. bovis* гладкие и белые с желтоватым оттенком. Организм растет медленно при температуре 37°C, но он не растет при 22°C или при 45°C. *Mycobacterium bovis* чувствительна к гидразиду тиофен – 2 - карбоновой кислоты (ТСН) и к гидразиду изоникотиновой кислоты (ИНН). Это можно проверить посредством роста на агаровой среде Middlebrook 7H10 / 7H11 или на яичной среде. Яичную среду следует готовить без добавления пирувата, потому что он подавляет гидразид изоникотиновой кислоты и оказывать схожее влияние на гидразид тиофен – 2 – карбоновую кислоту (они являются аналогами), таким образом, давая ложноположительные (резистентные) результаты. Штаммы *Mycobacterium bovis* также чувствительны к пара-амино салициловой кислоте и стрептомицину. Эффективные концентрации препарата разные для яичной среды и среды на основе агара. Результаты по продуцированию никотиновой кислоты и снижению нитрата отрицательные у *M. bovis*. В реакции с использованием амидазы, *M. bovis* является положительной в отношении уреазы и отрицательной в отношении никотинамидазы и пиразинамидазы. Это микроаэрофильная и нехромогенная бактерия.

1.3. Методы распознавания нуклеиновой кислоты

Экспресс идентификацию изолятов до уровня комплекса *M. tuberculosis* можно провести с помощью Gen Probe ТВ комплексного ДНК-зонда или полимеразной цепной реакции (ПЦР), нацеленной на 16S-23S рРНК; при этом используются инсерционные последовательности IS6110 и IS1081 и гены, кодирующие белки, специфичные для комплекса *M. tuberculosis*, например, MPB70 и 38kDA антиген b.

Специфическую идентификацию изолята можно провести с помощью ПЦР, нацеленной на мутацию в нуклеотидных позициях 285 в гене *oxyR*, 169 в гене *pncA*, 675/756/1311/1410 и 1450 в гене *gyrB* и на наличие\отсутствие областей различия гена (RD) (Espinosa de los Monteros et al., 1998; Huard et al., 2003; Niemann et al., 2000;

Parsons et al., 2002). В качестве альтернативы для методики молекулярного типирования сполиготипирование, например, позволяет идентифицировать изоляты *M. bovis* и предоставляет информацию о молекулярном типировании изолята, представляющего эпидемиологическую ценность (Kamerbeek et al., 1997).

Полимеразная цепная реакция прошла всестороннюю оценку с точки зрения ее способности обнаружения комплекса *M. tuberculosis* в клинических образцах (в основном в мокроте) у людей, и недавно ее стали использовать для диагностики туберкулеза у животных. Была проведена оценка широкого ряда имеющихся в продаже наборов и различных внутрихозяйственных методов для обнаружения комплекса *M. tuberculosis* в свежих и зафиксированных тканях. Для данных целей пользовались различными праймерами, перечисленными выше. Продукты амплификации анализировали с помощью гибридизации с зондами или с помощью электрофореза в геле. Коммерческие наборы и внутрипроизводственные методы, применяемые на свежих, замороженных тканях или тканях, законсервированных в борной кислоте, демонстрировали изменчивые и не особо удовлетворительные результаты при межлабораторном сравнении (Noredhoek et al., 1996). Ложноположительные и ложноотрицательные результаты, особенно для образцов, в которых содержатся небольшие количества бацилл, снизили достоверность данных тестов. Непостоянство результатов объясняется низким содержанием числа копий последовательности-мишени на бациллу в сочетании с низким содержанием бацилл. Непостоянство также связывали с использованием методов деконтаминации, процедур экстрагирования ДНК, методов для исключения ингибиторов полимеразного фермента, внешних и внутренних контролей и процедур, направленных на предотвращение перекрестной контаминации. Усовершенствование надежности полимеразной цепной реакции, как практического теста для обнаружения комплекса *M. tuberculosis* в свежих клинических образцах, потребует разработки стандартизированных и надежных процедур. Перекрестная контаминация представляет существенную проблему для данного применения, поэтому при каждой амплификации требуются надлежащие проверки. Однако в некоторых лабораториях в настоящее время ПЦР используется в качестве рутинного теста для обнаружения группы бактерий *M. tuberculosis* в тканях, залитых парафином (Miller et al., 1997; 2002). Хотя прямой ПЦР может выдавать быстрые результаты, рекомендуется параллельное использование культуры для подтверждения наличия жизнеспособного *M. bovis*.

Разработаны разные методики ДНК фингерпринтинга, чтобы установить отличия изолятов комплекса *M. tuberculosis* для эпизоотологических целей. Эти методы могут выявлять отличия между разными штаммами *M.bovis* и позволяют описать паттерны происхождения, передачи и распространения *M.bovis* (Durr et al., 2000a; 2000b).

Чаще всего используется метод сполиготипирования (от «спейсерного олиготипирования»), который позволяет дифференцировать штаммы внутри каждого вида, принадлежащего к комплексу *M. tuberculosis*, включая *M. bovis*, с помощью него также можно провести дифференциацию между *M. bovis* и *M. tuberculosis* (Heifets & Jenkins, 1998; Kamerbeek et al., 1997). Поощряется использование стандартной номенклатуры для сполиготипов в соответствии с базой данных Mbovis.org (<http://www/mbovis.org>), что позволяет проводить международное сравнение профилей.

К другим методикам относятся анализ рестрикционной эндонуклеазы (REA) и полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) с зондом IS6110 (особенно, если в изоляте >3-4 копий IS6110), зондом участка прямой повторности (DR), зондом PGRS (полиморфная GC повторная последовательность) (Skuce et al., 1996) и зондом pUCD (O'Brian et al., 2000). Был разработан вариант типирования MIRU-VNTR (микобактериальные, рассеянные повторяющиеся единицы (MIRU) – вариабельные тандемные повторы), позволяющий еще очевидней продемонстрировать разницу видов, входящих в комплекс *M.tuberculosis* (Frothingham & Meeker-O'Connell, 1998; Supply et al., 2000). Для максимальной дифференциации между штаммами можно воспользоваться сочетанием методов (Cousins et al., 1998).

Геном *M.bovis* был секвенирован (Garnier et al., 2003) и полученная в результате информация позволила значительно усовершенствовать методы генетического фингерпринтинга и разработать анализы ПЦР, которые определяют подвиды комплекса *M.tuberculosis*.

2. Реакция гиперчувствительности замедленного типа

2.1.Туберкулиновая проба (тест, установленный для целей международной торговли)

Стандартный метод обнаружения туберкулеза КРС – туберкулиновая проба, которая представляет собой внутрикожную инъекцию очищенного протеинового деривата туберкулина (ППД) для КРС и последующее образование припухлости (гиперчувствительность замедленного типа) на месте инъекции через 72 часа. Тест

можно проводить с использованием как одного лишь туберкулина для КРС, или в качестве сравнительного теста, используя туберкулин и для птиц, и для КРС. Туберкулиновую пробу обычно ставят на средней части шейного отдела, также ее можно ставить в каудальной складке хвоста. Кожа шеи более чувствительна к туберкулину, чем кожа каудальной складки. Для того чтобы компенсировать эту разницу, для каудальной складки можно использовать более высокие дозы туберкулина.

Замедленная гиперчувствительность может не проявляться в течение 3-6 недель после инъекции. Следовательно, если есть подозрение, что стадо животных недавно контактировало с зараженными животными, необходимо предусмотреть возможность отсрочить тестирование, чтобы свести к минимуму вероятность ложноотрицательных результатов. Поскольку чувствительность теста составляет менее 100%, то маловероятно, что искоренить туберкулез в стаде удастся только лишь с помощью одной туберкулиновой пробы. Необходимо признать, что при использовании на хронически зараженных животных с тяжёлыми патологическими изменениями, туберкулиновая проба может и не дать никакой ответной реакции. Туберкулиновая проба не валидирована надлежащим образом для большинства видов, не относящихся к бычьим и оленьим.

Сравнительная внутрикожная туберкулиновая проба используется с целью дифференциации животных, инфицированных *M. bovis* и животных, реагирующих на туберкулин для КРС в результате воздействия других микобактерий. Сенсибилизацию можно объяснить антигенной перекрестной реактивностью среди различных видов микобактерий и связанных с ними родов. При проведении теста туберкулин для КРС и птиц вводят внутрикожно в разные участки, обычно на одной стороне шеи, оценивая ответ через 3 дня.

Иммуногенность туберкулинов может быть оценена с помощью биологических методов, основанных на сравнении со стандартными туберкулинами, иммуногенность выражается в международных единицах (МЕ). В некоторых странах иммуногенность туберкулина для КРС считается приемлемой в том случае, если оцененная иммуногенность обеспечивает дозу для одного животного (КРС), как минимум 2000 МЕ ($\pm 25\%$). Для КРС с пониженной аллергической чувствительностью необходима более высокая доза туберкулина для КРС, а для проведения национальных кампаний

по искоренению рекомендуются дозы до 5000 МЕ. Объем каждой дозы для инъекции не должен превышать 0,2 мл.

2.1.1. Процедура тестирования

- i) Важно корректно выполнить инъекцию. Место инъекции необходимо очистить от волос и продезинфицировать. Складку кожи на выбритом участке измеряют при помощи штангенциркуля, и на месте инъекции ставят отметку. Градуированный шприц с короткой иглой, скошенный край которой направлен наружу, наполненный туберкулином, под наклоном вводят в глубокие слои кожи. Затем вводят дозу туберкулина. Можно воспользоваться многодозовым шприцом или шприцом-пистолетом для многократных инъекций, при условии, что соблюдены все меры безопасности и обеспечена подача необходимого объема препарата. Доза вводимого туберкулина должна составлять не менее 2000 МЕ туберкулина для КРС и птиц. Правильное введение подтверждается пальпированием небольшой припухлости в виде горошины на каждом участке инъекции. Расстояние между двумя инъекциями должно быть примерно 12 – 15 см. Молодым животным, которым нет возможности сделать инъекции на достаточном расстоянии друг от друга на одной стороне шеи, необходимо делать по одной инъекции на обеих сторонах шеи в одинаковых участках в центре средней трети шеи. Толщину складок кожи на месте каждой инъекции измеряют через 72 часа после инъекции. Тот же специалист должен измерять кожу до инъекции и во время считывания результатов теста.
- ii) Было разработано несколько альтернативных методов интерпретации ответных реакций на кожную пробу, с учетом того факта, что ложноположительные реакции могут быть вызваны восприимчивостью к другим микобактериям и местным воспалением. Важно осознавать, что между чувствительностью и специфичностью есть баланс, и максимально совпадающих значений можно и не получить. Необходимо внедрять в практику подходящие стратегии в зависимости от превалентности болезни и в соответствии с риском (например, наличие резервуара болезни в дикой природе).

Интерпретация основана на наблюдении и на зарегистрированных увеличениях толщины складок кожи. При постановке единичной внутрикожной туберкулиновой пробы (для которой требуется однократная инъекция туберкулина для КРС) реакцию обычно считают отрицательной, только если наблюдается ограниченная припухлость, с увеличением не более 2 мм и без клинических признаков (таких, как обширный или диффузный отек, экссудация, некроз, боль или воспаление лимфатических каналов в этом участке или, воспаление лимфатических узлов).

Реакция считается неокончательной, если не наблюдается ни один из этих клинических признаков, и если увеличение толщины складки кожи более 2 мм и менее 4 мм. Реакция считается положительной, если наблюдаются клинические признаки, упомянутые выше, и если толщины складки кожи увеличена более чем на 4 мм. Более того, в стадах, инфицированных *M. bovis*, любая прощупываемая или видимая припухлость должна рассматриваться как положительный результат.

Иногда используется более строгая интерпретация, особенно для популяции высокой степени риска, или для контактных животных. Животных, по которым нельзя однозначно судить после однократной туберкулиновой пробы, следует тестировать еще раз с интервалом 42 дня, чтобы прошла десенсибилизация (в некоторых регионах 60 дней для КРС и 120 дней для оленей). Животных, не являющихся отрицательными при проведении второй пробы, следует считать положительными. Животные, которые являются положительными при проведении однократной туберкулиновой пробы, могут пройти сравнительную внутрикожную пробу или анализ крови. Повторное тестирование можно проводить в соответствии со стандартными национальными и местными контрольными программами.

iii) При интерпретации результатов внутрикожной сравнительной пробы, реакцию считают положительной в том случае, если толщина кожи на участке инъекции туберкулина для КРС больше, чем на 4 мм превышает толщину, отмеченную при реакции в месте инъекции туберкулина для птиц. Реакцию считают неубедительной, если толщина кожи на участке инъекции бычьего туберкулина больше, чем при реакции в случае инъекции туберкулина для птиц (с разницей менее 4 мм). Реакция считается отрицательной, если толщина кожи на участке инъекции туберкулина для

КРС менее или равна толщине кожи в месте введения туберкулина для птиц. Эта схема интерпретации используется в странах Европейского Союза и рекомендована Директивой Совета 64 / 432 / ЕЕС (ЕС, 1980). Иногда используется более строгая интерпретация.

iv) Для пробы в каудальной складке хвоста используется короткая игла, которую вводят под наклоном скошенным краем наружу в глубокие слои кожи, посередине длины складки и посередине между линией волос и вентральной частью складки. Стандартная интерпретация такова, что любое пальпируемое или видимое изменение считается реакцией. Используется также модифицированная интерпретация: положительная проба – это любая видимая или пальпируемая припухлость на месте инъекции, толщина которой на 4 мм отличается от толщины на противоположной каудальной складке. При наличии у животного только одной каудальной складки пробу считают положительной, если толщина этой складки 8 мм или больше.

3. Лабораторные анализы крови

В настоящее время кроме классической внутрикожной туберкулиновой пробы стали доступны новые диагностические тесты, проводимые на образцах крови (Naagsma, 1993). Из-за высокой стоимости и более сложной процедуры проведения такие лабораторные анализы обычно используют в качестве дополнительных тестов для максимального выявления зараженных животных (параллельное тестирование); или подтверждения\отрицания результатов внутрикожной пробы (серийное тестирование). Доказано, что при постановке кожной пробы зараженному животному в течение последующей недели может проявиться усиленная реакция крови. Указанные наблюдения позволяют лучше разграничить ответные реакции на тест крови *in-vitro*, повысив тем самым точность тестирования. Реакция пролиферации лимфоцитов и гамма-интерферонный анализ измеряют клеточный иммунитет, в то время как ИФА измеряет гуморальный иммунитет.

3.1. Гамма-интерферонный анализ

При проведении этого анализа измеряется высвобождение лимфокина (гамма интерферона IFN- γ) в системе культуры цельной крови. Анализ основан на высвобождении гамма-интерферона из сенсibilизированных лимфоцитов во время 16 – 24 часового периода инкубации со специфическим антигеном (очищенный протеиновый дериват туберкулина ППД) (Wood et al., 1990). В тесте используется сравнение продуцирования гамма-интерферона после стимуляции ППД для КРС и ППД

для птиц. Обнаружение гамма-интерферона КРС проводится при помощи сэндвич-варианта ИФА, в котором используют два вида моноклональных антител к гамма-интерферону КРС. Рекомендуется доставлять образцы крови в лабораторию и проводить тест в кратчайшие сроки, но не позднее, чем через день после отбора образцов крови (Coad et al., 2007; Ryan et al., 2000). Ряд опасений был высказан относительно точности теста в тех регионах, где широко распространена «неспецифичность». Однако благодаря способности IFN- γ теста выявлять раннее заражение, параллельное использование двух тестов позволяет выявить большее количество зараженных животных еще до того, как они станут источником инфекции для других животных, или источником контаминации окружающей среды (Gormley et al., 2006). Применение специально подобранных микобактериальных антигенов ESAT-6 и CFP10, повышает специфичность теста (Buddle et al., 2001). Эти антигены используют в ряде стран, например, в Соединенном Королевстве и Новой Зеландии для серийного тестирования. Применение таких антигенов также делает возможным дифференцировать животных, вакцинированных от BCG, от невакцинированных животных. Если речь идет о животных, с которыми трудно обращаться, например, легковозбудимый КРС или другие представители семейства bovidae, то преимущество IFN- γ теста над кожной пробой заключается в том, что животных необходимо поймать только один раз. IFN- γ тест был утвержден для использования в рамках некоторых национальных программ, включая программы Европейского Союза (ЕС), США, Новой Зеландии, Австралии. Например, в Новой Зеландии и Соединенном Королевстве IFN- γ тест используется для серийного тестирования (чтобы усилить специфичность) и в параллельном тестировании (чтобы усилить чувствительность). Тест доступен в коммерческих наборах для КРС и приматов; однако валидирован он лишь для немногих видов.

3.2. Реакция пролиферации лимфоцитов

Этот тип анализа *in-vitro* сравнивает реактивность лимфоцитов периферической крови по отношению к очищенному белковому деривату туберкулина (ППД-В) и ППД из *Mycobacterium avium* (ППД-А). Реакцию можно проводить как на цельной крови (Buddle et al., 2001), так и на очищенных лимфоцитах из образцов периферической крови (Griffin et al., 1994). При помощи этих тестов предпринимаются попытки увеличить специфичность анализа посредством удаления ответов лимфоцитов на «неспецифические» или перекрестно реагирующие антигены, связанные с непатогенными видами микобактерий, воздействию которых животное могло

подвергаться. Результаты обычно анализируют как показатели, полученные при ответе на очищенный белковый дериват В минус показатель, полученный при ответе на очищенный белковый дериват А. Показатель В – А должен быть выше точки деления, которую можно изменить для того, чтобы увеличить до предела либо специфичность, либо чувствительность диагноза. Анализ имеет научную ценность, но он не используется в качестве рутинного метода диагностики, потому что требует временных затрат, и проведение анализа в лабораторных условиях затруднено (для этого требуется длительная инкубация и использование радиоактивных нуклеотидов). Как и в случае с IFN- γ тестом, реакцию пролиферации лимфоцитов следует проводить сразу после отбора крови. Тест может быть полезным для диких животных и животных из зоопарка. Сообщалось, что анализ крови, включающий анализ бластогенеза лимфоцитов и ИФА, имеет высокую чувствительность и специфичность при диагностике заражения *M. bovis* среди оленей (Griffin et al., 1994). Этот тест является относительно дорогостоящим, и он еще не подвергался межлабораторным сравнениям.

3.3. Твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА)

Было предпринято много неудачных попыток разработать полезные с клинической точки зрения серодиагностические тесты для обнаружения туберкулеза. ИФА оказался самым подходящим вариантом теста для обнаружения антител, и он может быть скорее дополнением, чем альтернативой для тестов на основе клеточного иммунитета. Этот анализ можно использовать для КРС и оленей с подавленным иммунитетом.

Преимущество ИФА состоит в его простоте, но чувствительность ограничена по причине запоздалой и нерегулярной выработки гуморального иммунного ответа у КРС в течение болезни. Специфичность в этом случае тоже ограничена, если используются комплексные антигены, такие как туберкулин или культуральный фильтрат *M. bovis*. Однако сравнение уровней антител к ППД-В и ППД-А оказалось эффективным для увеличения специфичности в ИФА (Griffin et al., 1993). Однако гуморальный иммунный ответ у оленей вырабатывается ранее и более предсказуемо, и отмечено, что чувствительность сравнительного ИФА доходит для этого вида вплоть до 85 % (Griffin et al., 1993). Возможно усовершенствование при использовании комбинации различных антигенов, включая белки (например, МРВ70 и МРВ83, которые являются специфичными, но не обладают достаточной чувствительностью). Более того, в отношении животных, зараженных *M. bovis*, было описано анамнестическое увеличение, которое позволило получить лучшие результаты в ИФА через 2 – 8 недель после проведения стандартной туберкулиновой кожной пробы (Lyashchenko et al.,

2004). ИФА также может быть полезен для обнаружения *M. bovis* у диких животных. В Новой Зеландии ИФА утвержден в качестве дополнительного параллельного теста для выращиваемых на фермах оленей, который следует проводить через 13 – 33 дней после проведения кожной пробы на середине шеи (Griffin et al., 1994). Были разработаны и альтернативные форматы серотестов. Например, экспресс-тест бокового сдвига (ТВ StatPak) оказался эффективным для выявления больных туберкулезом животных, особенно среди некоторых домашних, диких (Lyashchenko et al., 2008) и зоопарковых животных, таких как южноамериканские верблюдовые, барсуки (Greenwald et al., 2003), среди нечеловекообразных приматов или слонов (Greenwald et al., 2009), для которых нет тестов на клеточный иммунитет (гамма-интерферонный анализ), а кожные пробы оказались ненадежными. Однако чувствительность для КРС остается относительно низкой. Тест в настоящее время лицензирован в США специалистами USDA для слонов и нечеловекообразных приматов и утвержден для барсуков в Соединенном Королевстве.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ.

В настоящее время единственной доступной вакциной против инфекций *M. bovis* является вакцина бацилла Кальметта — Герена (БЦЖ), которая представляет собой живой аттенуированный штамм *M. bovis*. Была доказана ее переменная эффективность при проведении опытов на КРС, что связывали с разными факторами, включая состав вакцины, способ ее введения и степень подверженности воздействию микобактерий окружающей среды (Skinner et al., 2001). Проводились тестирования ряда других вакцин, но было выявлено, что ни одна из них не могла вызвать защиту лучше, чем БЦЖ. Доказано, что эффективность БЦЖ варьируется также как и у людей. В настоящее время проводится тестирование ряда новых кандидатных вакцин.

В настоящее время подробно изучаются генетические характеристики организма, вызывающего туберкулез, уже опубликованы полные последовательности генома *M. tuberculosis*, *M. bovis* и БЦЖ (Пастер) (Brosch et al., 2002; Cole et al., 1998; Garnier et al., 2003). Данная информация может представлять особую ценность при идентификации генов, связанных с вирулентностью, а также при разработке субъединичной вакцины. В пораженных странах, не имеющих программ контроля тестирования и убоя, можно применять вакцинацию БЦЖ с целью сокращения распространения инфекции среди КРС, однако нет прочной уверенности в долгосрочном снижении превалентности болезни и в

обеспечении безопасности для людей и окружающей среды. Перед началом программы вакцинации, необходимо оптимизировать схему вакцинации в соответствии с местными условиями. Типичная дозировка должна составлять от 10^4 до 10^6 колониеобразующих единиц, вводимых подкожно. Вакцина должна быть произведена из стандартного референтного штамма, БЦЖ Пастер или Датский (ВОЗ\ФАО\МЭБ, 1994).

Важно признать, что использование вакцины затруднит проведение внутрикожных туберкулиновых проб или других иммунологических тестов, основанных на использовании туберкулина в качестве диагностического антигена. Следовательно, вакцинацию КРС не следует проводить в тех странах, где для контроля и для безопасной торговли используются меры, основанные на таком тестировании. Однако удалось достичь существенных успехов в разработке так называемых антигенов DIVA, которые позволяют дифференцировать БЦЖ вакцинированных животных от тех, что заражены *M.bovis*, особенно когда их используют в гамма-интерферонном анализе (Buddle et al., 1999; Cockle et al., 2006; Sidders et al., 2008; Vordermeier et al., 2001). Такие антигены основаны на использовании антигенов, закодированных на участках гена *M.bovis*, удаленных в БЦЖ (как то ESAT-6 и CFP-10 [Buddle et al., 1999; Vordermeier et al., 2001]), недостаточно экспрессированных в некоторых штаммах БЦЖ (как то MPB83) или не секретированных в БЦЖ (как то Rv3615c [Sidders et al., 2008]). Следовательно, можно рассмотреть вариант БЦЖ вакцинации в сочетании с такими DIVA тестами, как только реагенты будут полностью валидированы и будут внесены соответствующие поправки в нормативную базу. БЦЖ вакцины могут также использоваться с целью сокращения распространения *M. bovis* в резервуарах инфекции среди диких животных. До начала такой вакцинации необходимо валидировать систему доставки для отдельных видов диких животных. Необходимо также учитывать влияние вакцины на другие виды животных при ее попадании в окружающую среду.

Руководства для производства ветеринарных вакцин даны в Главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, указанные здесь и в Главе 1.1.8 считаются общими по содержанию, и их можно дополнить в соответствии с национальными или региональными требованиями. Туберкулиновые препараты изначально были приготовлены из термически-обработанных продуктов роста и лизиса *M. tuberculosis* или *M. bovis* (известных, как туберкулин для КРС и туберкулин человека, соответственно), выращенных в бульоне с глицерином.

В 1940-х годах туберкулины, термоконцентрированные в синтетической среде, или HCSM туберкулины, приготовленные из культур в синтетической жидкой среде, заменили «старые» туберкулины. Старые туберкулины и HCSM туберкулины были замены почти по

всему миру очищенными белковыми дериватами или ППД. ППД для КРС, приготовленные из производственного штамма *M.bovis* AN5, более специфичны для выявления туберкулеза КРС, чем ППД, приготовленные из *M.tuberculosis*.

C1 Производство туберкулина

1. Работа с посевным материалом

1.1. Характеристика посевного материала

Штаммы *M. bovis*, используемые для приготовления посевных культур, должны быть идентифицированы по видам при помощи соответствующих тестов. Необходимо вести отчетность, в которой указано их происхождение и последующая история. Посевные культуры нельзя пассировать более 5 раз. Чаще всего используются производственные штаммы *M. bovis* AN5 или Vallee.

1.2. Метод культивирования

Если исходная культура была выращена на твердой среде, необходимо адаптировать организм к росту в качестве плавающей культуры (например, поместить стерильный кусок картофеля в колбы для культивирования клеток, в которых находится жидкая среда, например, среда Watson или среда Reid).

Когда культуру адаптируют к жидкой среде, ее можно использовать для продуцирования партии основного посевного материала, которую хранят в лиофилизированном виде. Его используют для высева на среду с целью производства партий вторичного посевного материала, который нельзя подвергать более чем четырем пассажам от основного посевного материала. Вторичный посевной материал используется для инокуляции производственных культур (Angus, 1978; Haagsma & Angus, 1994).

Необходимо показать, что субстрат производственной культуры пригоден для производства продукта, который соответствует признанным международным стандартам (ВОЗ, Европейская фармакопея, или другие признанные контрольные организации). Продукты должны быть свободными от ингредиентов, вызывающих токсические или аллергические реакции.

1.3. Валидация

Необходимо подтвердить, что штаммы *M. bovis*, которые используются в качестве посевных культур, свободны от контаминирующих организмов.

Должно быть доказано, что партии посевного материала эффективны при выработке туберкулина с достаточной иммуногенностью. Необходимые тесты описаны в Разделе С.4. ниже.

2. Метод производства

Организм культивируют в синтетической среде, протеин в фильтрате преципитируют химическим способом (используя сульфат аммония или трихлоруксусную кислоту (ТСА)), затем промывают и ресуспендируют. Рекомендуется использовать ППД туберкулин, поскольку его можно стандартизировать более точно. Можно также добавить antimicrobial консервант, препятствующий возникновению ложноположительных реакций, например, фенол (не более 5% [в/о]). Глицерин (не более 10% [в/о]) или глюкозу (2,2 % [в/о]) можно добавить в качестве стабилизаторов. Не следует использовать дериваты ртути. Продукт распределяют в асептических условиях в стерильные стеклянные контейнеры, которые затем герметично закрывают с целью предотвращения контаминации. Продукт можно лиофилизировать.

3. Контроль в процессе производства.

Флаконы, используемые в производстве, содержащие подходящие посевные культуры, инкубируют в течение соответствующего периода времени. Любую колбу, в которой обнаружена контаминация и рост, сильно отклоняющийся от нормы, после автоклавирования необходимо отбраковывать. Во время инкубации поверхность многих культур может увлажниться и погрузиться в среду, или на дно флакона. Что касается ППД туберкулинов, рН растворенного преципитата (так называемый концентрированный туберкулин) должен быть 6,6 – 6,7. Уровень протеина концентрата ППД определяют методом Кьельдаля или другим подходящим методом. Обычно сравнивают общий азот и азот, преципитированный с использованием трихлоруксусной кислоты. Необходимо провести биологические анализы готового продукта на морских свинках. Анализы специфичности и иммуногенности проводят в сопоставлении с референтным туберкулином (ППД). Дальнейшие разведения готовят при использовании буфера в соответствии с содержанием белка и требуемой конечной концентрацией, обычно, 1.0 мг/мл (Angus, 1978; Haagsma & Angus, 1994).

4. Контроль партии

Образцы должны соответствовать официально признанным стандартам производства туберкулина, установленным Европейской фармакопеей или эквивалентным регулирующим стандартом.

4.1. Стерильность

Тест на стерильность обычно проводят в соответствии с международными руководствами (см. также Главу I. 1. 9. *Тесты биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации*).

4.2. Безопасность

Двум морским свинкам, вес каждой из которых не менее 250 г, и которые ранее не подвергались воздействию никаких препаратов, препятствующих проведению теста, подкожно вводят 0,5 мл тестируемого туберкулина. В течение 7 последующих дней никаких явлений, отклоняющихся от нормы, быть не должно. Туберкулиновые пробы на наличие живых микобактерий можно проводить на туберкулине непосредственно до его распределения в готовые контейнеры, или на образцах, взятых из самих готовых контейнеров. Необходимо взять образец минимум 10 мл и ввести его внутривентрально минимум двум морским свинкам, разделяя дозу между ними. Желательно использовать образец большего объема, например, 50 мл и концентрировать любые остаточные микобактерии путем центрифугирования или мембранной фильтрации. За морскими свинками наблюдают минимум в течение 42 дней, затем проводят макроскопическое исследование при аутопсии. Любые обнаруженные поражения исследуют при помощи микроскопа и при культивировании.

4.3. Сенсibiliзирующий эффект

Чтобы проверить сенсibiliзирующий эффект, трем морским свинкам, которых раньше не подвергали воздействию никаких препаратов, препятствующих проведению теста, подкожно вводят в каждом из трех случаев эквивалент 500 МЕ тестируемого препарата объемом 0,1 мл.

Каждой морской свинке, вместе с каждой из трех контрольных морских свинок, которым до этого момента не делали инъекцию, через 15-21 день после третьей инъекции подкожно вводят такую же дозу того же туберкулина. Реакции в двух группах морских свинок не должны значительно отличаться при измерении через 24 – 28 часов.

4.4. Иммуногенность

Иммуногенность проверяют посредством сравнения с референтным препаратом туберкулина для КРС на морских свинках, сенсibiliзированных *M. bovis*.

Еще в 1960-х годах страны Европейского Экономического Сообщества (ЕЭС, в настоящее время ЕС) признали ЕЭС стандарт для ППД для КРС, иммуногенность которого установили на уровне 50 000 прогнозируемых туберкулиновых единиц Сообщества на мг ППД, и распределили в лиофилизированном виде. К сожалению, количество ампул с лиофилизированным препаратом было недостаточным для того, чтобы соответствовать требованиям ВОЗ, поэтому было решено произвести новый препарат ППД для КРС, который в соответствии с ВОЗ мог бы считаться новым международным стандартом для ППД туберкулинов для КРС.

Этот новый стандарт ППД для КРС необходимо было калибровать в сопоставлении с существующим стандартом ЕЭС. На основе совместных международных анализов, проводимых на морских свинках и на КРС, было обнаружено, что новый стандарт для КРС имеет относительную иммуногенность 65% в сравнении со стандартом ЕЭС. Поэтому в 1986 году ВОЗ официально определила международный стандарт для ППД туберкулинов для КРС на уровне 32,500 МЕ/мг. Это означает, что прогнозируемые туберкулиновые единицы Сообщества равнозначны МЕ. Европейская фармакопея также признала международный стандарт ВОЗ для ППД туберкулина для КРС.

Для сохранения запасов актуального международного стандарта, желательно, чтобы страны, производящие ППД туберкулин для КРС, установили в качестве рабочих стандартов свои национальные референтные препараты для ППД для КРС. Эти национальные референтные препараты необходимо калибровать по официальному международному стандарту для ППД для КРС, как на морских свинках, так и на КРС (Maxlid et al., 1976; Schneider et al., 1979; WHO, 1987).

4.4.1. Стандартизация на морских свинках

Морских свинок сенсibiliзируют при введении низкой дозы (например, 0,001 или 0,0001 мг массы сырого вещества) живых бацилл вирулентного штамма *M. bovis* за 5 – 7 недель до анализа. Бациллы суспендируют в физиологическом растворе, и затем глубоко внутримышечно вводят 1 мл в среднюю часть бедра. Во время анализа, морские свинки, которых инфицировали низкой дозой *M. bovis*, должны оставаться здоровыми, а результаты многочисленных аутопсических исследований, которые проводят сразу после стандартизированных анализов, должны свидетельствовать о том, что у морских свинок не наблюдается открытая форма туберкулеза, и, таким образом, они не выделяют туберкулезные бациллы.

Можно использовать альтернативный тест на иммуногенность, для проведения которого не требуются живые патогенные микобактерии, и который более подходит для лабораторий, где нет изолированных площадей для надежного содержания инфицированных морских свинок. Кроме того, данный вариант более удобен с точки зрения обеспечения благополучия экспериментальных животных.

Данный тест на иммуногенность туберкулина проводят следующим образом: биологическую пробу ППД туберкулина проводят на гомологически сенсibilизированных морских свинках в сопоставлении со стандартом для ППД туберкулина для КРС при помощи восьмиэтапного анализа, включающего 4 разведения, соответствующие 20, 10, 5 и 2,5 МЕ.

Объем инъекции составляет 0,1 мл. При проведении этого анализа два тестируемых туберкулина сравнивают со стандартным туберкулином на восьми морских свинках, вводя восемь внутрикожных инъекций каждому животному, придерживаясь полного уравнивания по схеме латинского квадрата. Морских свинок сенсibilизируют инактивированными бациллами *M. bovis* за 5 – 7 недель до проведения анализа. Бациллы суспендируют в буфере и превращают в эмульсию с использованием адьюванта Фрейнда. В среднюю часть бедра делают глубокую внутримышечную инъекцию. Доза инъекции составляет 0,5 мл.

Подходящий анализ на иммуногенность проводят следующим образом: Выработанные туберкулины ППД подвергают биологическому анализу на гомологически сенсibilизированных морских свинках в сопоставлении со стандартом для туберкулина ППД для КРС. Анализ включает 6 этапов, 3 разведения каждого туберкулина с пятикратными интервалами. Разведения туберкулиновых препаратов проводятся в изотоническом буферном растворе, содержащем 0,0005% (в/о) полисорбат 80 (Tween 80). Объемы 0,001, 0,0002 и 0,00004 мг туберкулопротеина, соответствующие международному стандарту для ППД на уровне 32, 6,4 и 1,28 МЕ соответственно, выбирают потому, что эти количества дают хорошо считываемые кожные реакции с допустимыми пределами. Объем инъекции составляет 0,2 мл. В одном анализе два тестируемых туберкулина сравнивают со стандартным туберкулином, испытывая его на 9 морских свинках, при помощи 8 внутрикожных инъекций для каждого животного, и придерживаясь полного уравнивания по схеме латинского квадрата (Finney, 1964).

Обычно, результаты анализа исследуют через 24 часа после введения туберкулина, но через 48 часов можно провести второе дополнительное считывание результатов. Разные диаметры эритемы измеряют при помощи штангенциркуля в миллиметрах и записывают в таблицы результатов анализа. Затем проводится статистическая оценка результатов при использовании статистических методов для параллельных анализов, в соответствии с Finney (1964). Показатели относительной иммуногенности двух тестируемых туберкулинов подсчитывают с пределом достоверности 95%, наклонами кривых ответной реакции на десятичный логарифм дозы для каждого препарата (увеличение среднего показателя реакции на единицу увеличения в десятичной дозе логарифма) и F соотношений для отклонений от параллелизма.

В соответствии с Европейской фармакопеей, оцененная иммуногенность туберкулинов для КРС должна быть не менее 66% и не более 150% иммуногенности, указанной на ярлыке.

4.4.2. Стандартизация туберкулина для КРС на КРС

Согласно техническому отчету ВОЗ по серии №384 тестирование иммуногенности необходимо проводить на тех видах животных, для которых предназначен указанный туберкулин, и в тех условиях, в которых тестируемые туберкулины будут использоваться на практике (ВОЗ, 1987). Это означает, что туберкулины для КРС следует тестировать на КРС, который подвергся естественному заражению туберкулезом. Поскольку это требование трудно выполнить, рутинное тестирование иммуногенности проводят на морских свинках. Однако необходимо периодическое тестирование на зараженном туберкулезом КРС, а стандартные препараты необходимо калибровать всегда на КРС. Частоту тестирования на КРС можно сократить при уверенности в том, что стандартные препараты характерны для рутинно используемых туберкулинов, и что процедуры производства гарантировано последовательны.

Подходящий анализ на иммуногенность бычьих туберкулинов проводится по следующей схеме: Туберкулины тестируют в сравнении со стандартом для туберкулина ППД для КРС с помощью четырехэтапного анализа, используя 2 разведения каждого туберкулина с пятикратными интервалами. Для стандарта,

вводят 0,1 и 0,02 мг туберкулопротеина, поскольку эти объемы, соответствуют 3250 и 650 МЕ, если используется международный стандарт для туберкулина ППД для КРС. Тестируемые туберкулины разводят таким образом, чтобы применять такую же массу протеинов. Объем инъекции составляет 0,1 мл, и расстояние между участками инъекции на средней поверхности шеи составляет 15 – 20 см. В одном анализе три тестируемые туберкулина сравнивают со стандартным туберкулином, используя восемь голов КРС, зараженных туберкулезом, и применяя по восемь внутрикожных инъекций для каждого животного (с обеих сторон шеи и придерживаясь полного уравнивания по схеме латинского квадрата).

Толщину кожи на участке каждой инъекции измеряют при помощи штангенциркуля до десятой доли миллиметра, как можно точнее до инъекции и через 72 часа после инъекции (Naagsma et al., 1984).

Статистическая оценка результатов проводится с использованием тех же стандартных методов для параллельных анализов, которые были использованы для проверки иммуногенности на морских свинках.

4.5. Специфичность

Анализ на специфичность проводится следующим образом: три туберкулина для КРС тестируют в сравнении со стандартом для туберкулина ППД для КРС (или три тестируемых туберкулина для птиц тестируют в сопоставлении со стандартом для туберкулина ППД для КРС). Анализ состоит из четырех этапов и проводится на гетерологически сенсibilизированных морских свинках, включает два разведения каждого туберкулина с 25-кратными интервалами. Выбирают количества 0,03 мг и 0,0012 мг тестируемого туберкулопротеина, соответствующие 975 и 39 МЕ, поскольку эти дозы дают хорошо различимые кожные реакции. Стандартные дозы для инъекций ниже, а именно 0,001 мг и 0,0004 мг. В одном анализе тестируемые туберкулины сравнивают со стандартным туберкулином, используя восемь морских свинок, проводя восемь внутрикожных инъекций для каждого животного и придерживаясь полного уравнивания по схеме латинского квадрата. Считывание результатов и статистическая оценка являются идентичными анализу на иммуногенность.

4.6. Стабильность

При условии, что туберкулины соответствуют законодательно установленным стандартам производства и хранятся при температуре 2 – 8⁰С в защищенном от света месте, их можно использовать до окончания срока хранения, указанного в лицензии на

производство туберкулина. Для более длительного хранения рекомендуется держать ППД в концентрированной, а не в разведенной форме. Концентрат также необходимо хранить в защищенном от света месте.

4.7. pH контроль

pH должен быть 6,5 – 7,5.

4.8. Содержание белка

Содержание белка определяется способом, указанным в Разделе С.3. Контроль в процессе производства.

4.9. Хранение

Туберкулин для КРС в жидкой форме необходимо хранить в защищенном от света месте при температуре $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Заморозка жидких продуктов может ухудшить качество. Однако можно приготовить лиофилизированные препараты и хранить их при более высоких температурах (но не превышающих 25°C) в защищенном от света месте. Периоды воздействия более высоких температур или прямых солнечных лучей должны быть сведены к минимуму.

4.10. Консерванты

Необходимо проверять, чтобы антимикробные консерванты или другие вещества, которые добавляют к туберкулину, не снижали его безопасность и эффективность. Максимальная допустимая концентрация фенола составляет 0,5% (в/о), глицерина – 10% (о/о).

4.11. Меры предосторожности (угрозы)

Опыт наблюдения за людьми и животными показывает, что разведенный надлежащим образом туберкулин, введенный внутрикожно, вызывает ограниченную реакцию на участке введения без генерализованных проявлений болезни. Даже у очень чувствительных особей, тяжелые, генерализованные реакции чрезвычайно редки и ограничены. Однако опыт показывает, что у специалиста с повышенной чувствительностью могут наблюдаться тяжелые генерализованные симптомы после случайного внутрикожного контакта (рана от укола иглой) с туберкулином для КРС. Таким людям не рекомендуется ставить туберкулиновую пробу с высокой дозой

туберкулина – 2000 – 5000 МЕ, что в 1000 раз превышает нормальную дозу для человека 5 МЕ.

5. Тестирование готового продукта

5.1. Безопасность

Необходимо проводить тест на отсутствие токсических или раздражающих характеристик (смотрите Раздел С.4.2.).

5.2. Иммуногенность

Иммуногенность туберкулина необходимо оценивать биологическими методами. Эти методы необходимо использовать для НСМ и ППД туберкулинов; эти методы основаны на сравнении тестируемых туберкулинов со стандартным справочным препаратом туберкулина того же типа (см. Раздел С.4.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ANGUS R.D. (1978). Production of reference PPD tuberculins for veterinary use in the United States. *J. Biol. Stand.*, 6, 221.

ANIMAL HEALTH DIVISION (NEW ZEALAND) (1986). Possum research and cattle tuberculosis. *Surveillance*, 13, 18–38.

ARANAZ A., COUSINS D., MATEOS A. & DOMINIGUEZ L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1785–1789.

BENGIS R.G., KRIEK N.P.J., KEET D.F., RAATH J.P., DE VOS V. & HUCHZERMEYER H.F.A.K. (1996). An outbreak of tuberculosis in a free-living African buffalo (*Syncerus caffer*, Sparrman) population in the Kruger National Park: A preliminary report. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 63, 15.

BROSCH R., GODON S.V., MARMIESSE M., BRODIN P., BUCHRIESER C., EIGLMEIER K., GARNIER T., GUTIERREZ C., HEWINSON G., KREMER K., PARSONS L.M., PYM A.S., SAMPER S., VAN SOOLINGEN D. & COLE S.T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99, 3684–3689.

BUDDLE B.M., PARLANE N.A., KEEN D.L., ALDWELL F.E., POLLOCK J.M., LIGHTBODY K. & ANDERSEN P. (1999). Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6 (1), 1–5.

BUDDLE B.M., RYAN T.J., POLLOCK J.M., ANDERSON P. & DE LISLE G.W. (2001). Use of ESAT-6 in the interferongamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet. Microbiol.*, 80, 37–46.

CLIFTON-HADLEY R.S. & WILESMITH J.W. (1991). Tuberculosis in deer: a review. *Vet. Rec.*, 129, 5–12.

COAD M., HEWINSON R.G., CLIFFORD D., VORDERMEIER H.M. & WHELAN A.O. (2007). Influence of skin testing and blood storage on interferon-gamma production in cattle affected naturally with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Rec.*, 160 (19), 660–662.

COCKLE P.J., GORDON S.V., HEWINSON R.G. & VORDERMEIER H.M. (2006). Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, 13 (10), 1119–1124.

COLE S.T., BROSCHE R., PARKHILL J., GARNIER T., CHURCHER C., HARRIS D., GORDON S.V., EIGLMEIER K., GAS S., BARRY C.E. 3RD, TEKAIA F., BADCOCK K., BASHAM D., BROWN D., CHILLINGWORTH T., CONNOR R., DAVIES R., DEVLIN K., FELTWELL T., GENTLES S., HAMLIN N., HOLROYD S., HORNSBY T., JAGELS K., KROGH A., MCLEAN J., MOULE S., MURPHY L., OLIVER K., OSBORNE J., QUAIL M.A., RAJANDREAM M.A., ROGERS J., RUTTER S., SEEGER K., SKELTON J., SQUARES R., SQUARES S., SULSTON J.E., TAYLOR K., WHITEHEAD S. & BARRELL B.G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393 (6685), 537–544.

CORNER L.A.L. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet. Microbiol.*, 112, 303–312.

COUSINS D.V. (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 20, 71–85.

COUSINS D.V., BASTIDA R., CATALDI A., QUSE V., REDROBE S., DOW S., DUIGNAN P., MURRAY A., DUPONT C., AHMED A., COLLINS D.M., BUTLER W.R., DAWSON D., RODRIGUEZ D., LOUREIRO J., ROMANO M.I., ALITO A., ZUMARRAGA M. & BERNARDELLI A. (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1305–1314.

COUSINS D.V. & FLORISSON N. (2005). A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in nonbovine species. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24 (3).

COUSINS D.V., FRANCIS B.R. & GOW B.L. (1989). Advantages of a new agar medium in the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.*, 20, 89–95.

COUSINS D.V., SKUCE R.A., KAZWALA R.R. & VAN EMBDEN J.D.A. (1998). Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2, 471–478.

DE LISLE G.W., MACKINTOSH C.G. & BENGIS R.G. (2001). *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 20, 86–111.

DURR P.A., CLIFTON-HADLEY R.S. & HEWINSON R.G. (2000a). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. II. Applications of genotyping. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 19, 689–701.

DURR P.A., HEWINSON R.G. & CLIFTON-HADLEY R.S. (2000b). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. *Mycobacterium bovis* genotyping. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 19, 675–688.

ESPINOSA DE LOS MONTEROS L.E., GALAN J.C., GUTIERREZ M., SAMPER S., GARCIA MARIN J.F., MARTIN C., DOMINGUEZ L., DE RAFAEL L., BAQUERO F., GOMEZ-MAMPASO E. & BLAZQUEZ J. (1998). Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *M. tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 239–242.

EUROPEAN UNION (1980). Council Directive 80/219, amending Directive 64/432, Annex B.

FINNEY D.J. (1964). *Statistical Methods in Biological Assays*, Second Edition. Charles Griffin, London, UK.

FROTHINGHAM R. & MEEKER-O'CONNELL W.A. (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem. *Microbiology*, 144, 1189–1196.

GARNIER T., EIGLMEIER K., CAMUS J.C., MEDINA N., MANSOOR H., PRYOR M., DUTHOY S., GRONDIN S., LACROIX C., MONSEMPE C., SIMON S., HARRIS B., ATKIN R., DOGGETT J., MAYES R., KEATING L., WHEELER P.R., PARKHILL J., BARRELL B.G., COLE S.T., GORDON S.V., HEWINSON R.G. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100 (13), 7877–7882.

GORMLEY E., DOYLE M.B., FITZSIMONS T., MCGILL K. & COLLINS J.D. (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet. Microbiol.*, 112 (2–4), 171–179.

GREENWALD R., ESFANDIARI J., LESELLIER S., HOUGHTON R., POLLOCK J., AAGAARD C., ANDERSEN P., HEWINSON R.G., CHAMBERS M. & LYASHCHENKO K. (2003). Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*) using multiantigen test formats. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 46 (3), 197–203.

GREENWALD R., LYASHCHENKO O., ESFANDIARI J., MILLER M., MIKOTA S., OLSEN J.H., BALL R., DUMONCEAUX G., SCHMITT D., MOLLER T., PAYEUR J.B., HARRIS B., SOFRANKO D., WATERS W.R. & LYASHCHENKO K.P. (2009). Highly accurate antibody assays for early and rapid detection of tuberculosis in African and Asian elephants. *Clin. Vaccine Immunol.*, 16 (5), 605–612

GRIFFIN J.F.T., CROSS J.P., CHINN D.N., ROGERS C.R. & BUCHAN G.S. (1994). Diagnosis of tuberculosis due to *M. bovis* in New Zealand red deer (*Cervus elaphus*) using a composite blood test (BTB) and antibody (ELISA) assays. *N.Z. Vet. J.*, 42, 173–179.

GRIFFIN J.F.T., HESKETH J.B., MACKINTOSH C.G., SHI Y.E. & BUCHAN G.S. (1993). BCG vaccination in deer: distinctions between delayed type hypersensitivity and laboratory parameters of immunity. *Immunol. Cell Biol.*, 71, 559–570.

HAAGSMA J. (1993). Working Paper on Recent Advances in the Field of Tuberculosis Control and Research. World Health Organization Meeting on Zoonotic Tuberculosis with Particular Reference to *Mycobacterium bovis*, 15 November 1993, Geneva, Switzerland.

HAAGSMA J. & ANGUS R.D. (1994). Tuberculin production. In: *Mycobacterium bovis* Infections in Humans and Animals, Steele J.H. & Thoen C.O., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

HAAGSMA J., O'REILLY L.M., DOBBELAAR R. & MURPHY T.M. (1984). A comparison of the relative potencies of various bovine PPD tuberculins in naturally infected tuberculous cattle. *J. Biol. Stand.*, 10, 273.

HEIFETS L.B. & JENKINS P.A. (1998). Speciation of *Mycobacterium* in clinical laboratories. In: *Mycobacteria I. Basic Aspects*, Gangadharam P.R. & Jenkins P.A., eds. Chapman and Hall, New York, USA, 308–350.

HUARD R.C., DE OLIVEIRA LAZZARINI L.C., BUTLER W.R., VAN SOOLINGEN D. & HO J.L. (2003). PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J. Clin. Microbiol.*, 41 (4), 1637–1650.

KAMERBEEK J., SCHOULS L., KOLK A., VAN AGTERVELD M., VAN SOOLINGEN D., KUIJPER S., BUNSCHOTEN A., MOLHUIZEN H., SHAW R., GOYAL M. & VAN EMBDEN J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 907–914.

LYASHCHENKO K.P., GREENWALD R., ESFANDIARI J., CHAMBERS M.A., VICENTE J., GORTAZAR C., SANTOS N., CORREIANEVES M., BUDDLE B.M., JACKSON R., O'BRIEN D.J., SCHMITT S., PALMER M.V., DELAHAY R.J. & WATERS W.R. (2008). Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of freeranging wildlife. *Vet. Microbiol.*, 132 (3–4), 283–292.

LYASHCHENKO K., WHELAN A.O., GREENWALD R., POLLOCK J.M., ANDERSEN P., HEWINSON R.G. & VORDERMEIER H.M. (2004). Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M. bovis*. *Infect. Immun.*, 72 (5), 2462–2467.

MAXILD J., BENTZON M.W., MOLLER S. & ZACHARIASSEN P. (1976). Assays of different tuberculin products performed in guinea pigs. *J. Biol. Stand.*, 4, 171.

MILLER J., JENNY A. & PAYEUR J. (2002). Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium bovis* and *M. avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative organisms. *Vet. Micro.*, 2328, 1–9.

MILLER J., JENNY A., RHGYAN J., SAARI D. & SAUREZ D. (1997). Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *M. tuberculosis* complex organisms. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 9, 244–249.

MORRIS R.S., PFEIFFER D.U. & JACKSON R. (1994). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol.*, 40, 153–157.

NARANJO V., GORTAZAR C., VICENTE J. & DE LA FUENTE J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet. Microbiol.*, 127 (1–2), 1–9.

NIEMANN S., HARMSSEN D., RUSCH-GERDES S. & RICHTER E. (2000). Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 38 (9), 3231–3234.

NOREDHOEK G.T., VAN EMBDEN J.D.A. & KOLK A.H.J. (1996). Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 2522–2525.

O'BRIAN R., DANILOWICZ B.S., BAILEY L., FLYNN O., COSTELLO E., O'GRADY D. & RODGERS M. (2000). Characterisation of the *Mycobacterium bovis* restriction fragment length polymorphism DNA probe pUCD and performance comparison with standard methods. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 3362–3369.

O'REILLY L.M. & DABORN C.J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Dis. (Suppl. 1)*, 76, 1–46.

PARSONS L.M., BROSCH R., COLE S.T., SOMOSKOVI A., LODER A., BRETZEL G., VAN SOOLINGEN D., HALE Y.M. & SALFINGER M. (2002). Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 40 (7), 2339–2345.

PRODINGER W.M., BRANDSTATTER A., NAUMANN L., PACCIARINI M., KUBICA T., BOSCHIROLI M.L., ARANAZ A., NAGY G., CVETNIC Z., OCEPEK M., SKRYPNYK A., ERLER W., NIEMANN S., PAVLIK I. & MOSER I. (2005). Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 4984–4992.

RYAN T.J., BUDDLE B.M. & DE LISLE G.W. (2000). An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res. Vet. Sci.*, 69, 57–61.

SCHNEIDER W., DOBBELAER R., DAM A., JORGENSEN J.B., GAYOT G., AUGIER J., HAAGSMA J., REES W.H.G., LESSLIE I.W. & HEBERT C.N. (1979). Collaborative assay of EEC standards for bovine tuberculins. *J. Biol. Stand.*, 7, 53.

SIDDERS B., PIRSON C., HOGARTH P.J., HEWINSON R.G., STOKER N.G., VORDERMEIER H.M. & EWER K. (2008). Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect. Immun.*, 76 (9), 3932–3939.

SKINNER M.A., WEDLOCK D.N. & BUDDLE B.M. (2001). Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. *Mycobacterial Infections in Domestic and Wild Animals. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 20, (in press).

SKUCE R.A., BRITAIN D, HUGHES M.S. & NEILL S.D. (1996). Differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates from animals by DNA typing. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2469–2474.

SUPPLY P., MAZARS E., LESJEAN S., VINCENT V., GICQUEL B. & LOCHT C. (2000). Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.*, 36, 762–771.

VORDERMEIER H.M., WHELAN A., COCKLE P.J., FARRANT L., PALMER N. & HEWINSON R.G. (2001). Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8 (3), 571–578.

WILESMITH J.W. (1991). Epidemiological methods for investigating wild animal reservoirs of animal disease. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 10, 205–214.

WOOD P.R., CORNER L.A. & PLACKETT P. (1990). Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res. Vet. Sci.*, 49, 46–49.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1987). Requirements for Biological Substances No. 16, Annex 1: Requirements for Tuberculins. Technical Report Series No. 745, WHO, Geneva, Switzerland, 31–59.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)/OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (1994). Report on Consultation on Animal Tuberculosis Vaccines. WHO, Veterinary Public Health Unit, Geneva. WHO/CDS/VPH/94.138.

* * *

NB:

Существуют Справочные лаборатории МЭБ по туберкулезу КРС (см. Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным* или можно обратиться на сайт МЭБ и изучить последний список: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Вы можете обратиться в референтные лаборатории МЭБ для получения дополнительной информации о диагностических тестах, реагентах и вакцинах от туберкулеза КРС.