

УДК 619:616.98:579.873.21:636.9

**ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ ПАРАТУБЕРКУЛЕЗА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНФИЦИРОВАННЫХ  
*M. AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS (MAP)* ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ****Завгородний А.И., Позмогова С.А., Гирка М.А., Шутченко П.А., Медведь Е.А.**

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», Харьков, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

*В статье представлены результаты патологоанатомического и гистологического исследования экспериментально инфицированных референтным штаммом и полевой культурой MAP мышей, кроликов и морских свинок. Определена наиболее чувствительная биологическая модель для воспроизведения паратуберкулеза, оптимальная доза и способ заражения, а также возраст животного для заражения. Установлено, что кролики 1-месячного возраста наиболее восприимчивы к возбудителю паратуберкулеза; внутривенное двукратное заражение в дозе 2 мг/см<sup>3</sup> индуцирует патологические изменения характерные для паратуберкулеза КРС у 100 % инфицированных кроликов, из них 50 % погибает в течение 3-х месяцев. На мышинной модели патологические изменения менее выражены. Наиболее устойчивыми к заражению являются морские свинки.*

**Ключевые слова:** биологическая модель, воспроизведение паратуберкулеза, лабораторные животные, способы заражения, патологоанатомические и гистоморфологические изменения.

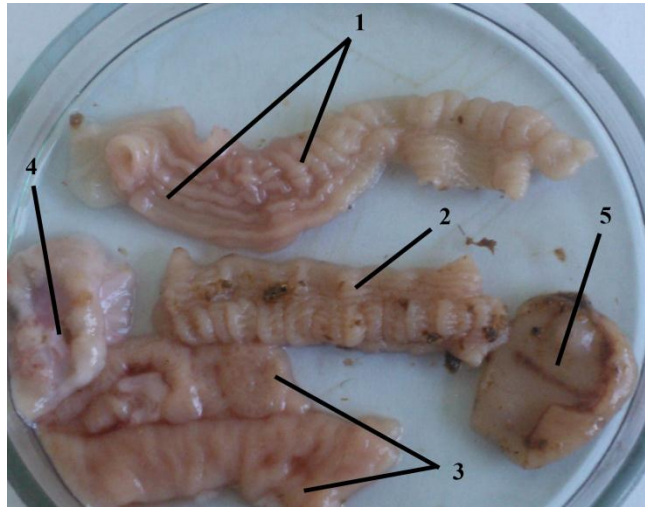
Большим препятствием в изучении патогенеза, разработки эффективных методов диагностики и совершенствования мер борьбы с паратуберкулезом является отсутствие биологической модели. Данные литературы о возможном воспроизведении болезни на лабораторных животных являются противоречивыми. Многочисленные попытки исследователей воспроизвести паратуберкулез у мелких животных: кроликов, морских свинок, крыс, мышей, кур, собак, хорьков, сусликов, не увенчались успехом при применении самых разнообразных способов заражения. Так по данным Veazey и др. (1995) пероральная инокуляция MAP (10<sup>11</sup> КОЕ) мышам продуцирует гранулематозное поражение мезентериальных лимфатических узлов только у 58 % животных. Tanaka и соавт., (2000) при интраперитонеальном введении малых доз MAP (10<sup>6</sup> КОЕ) наблюдали лишь небольшое количество эпителиоидных гранул, но при увеличении инфекционной дозы (10<sup>8</sup> КОЕ) развивались мультифокальные гранулемы, состоящие из макрофагов и эпителиоидных клеток. Mutwiri и соавт., (1992) считают, что для воспроизведения инфекции у мышей наиболее эффективно проводить интраперитонеальное введение MAP. На сегодняшний день, все представленные модели на кроликах для изучения патогенеза включают пероральное введение MAP, однако при таком способе инокуляции, инфекция развивается не у всех животных. Так Mokresh и соавт., (1990), несмотря на высокую дозу заражения 10<sup>7</sup> КОЕ, никаких признаков инфекции не наблюдали почти у 50 % инфицированных животных, увеличение дозы до 10<sup>8</sup> КОЕ приводило к развитию инфекции у 70 % инфицированных кроликов. Эти неудачи, объясняются недостаточно изученными условиями заражения и состояния организма животных, при котором может наступить развитие болезни. Важными параметрами в индуцировании паратуберкулезных изменений у лабораторных животных являются способ и кратность введения, доза (концентрация MAP) заражения и возраст животных.

**Целью** наших исследований было подобрать оптимальную биологическую модель лабораторного животного для воспроизведения паратуберкулеза с учетом дозы, способа заражения и возраста животных.

**Материалы и методы.** Для заражения были отобраны клинически здоровые, ранее не реагировавшие на туберкулин (ППД) для млекопитающих и птиц, морские свинки (n=8), белые мыши (n=32), крольчата 1-месячного (n=12), 3-месячного (n=12), 6-месячного (n=12) возраста. Животных инфицировали референтным штаммом *M. Johnei* и выделенной от КРС эпизоотической культурой № 5809. Морских свинок заражали интраперитонеально, кроликов 1, 3 и 6-месячного возраста – внутривенно и интраперитонеально, мышей – перорально и интраперитонеально. Заражение морских свинок и кроликов проводили двукратно, с интервалом 14 дней, в дозе 2 мг/см<sup>3</sup>. Пероральное заражение мышей проводили 3-кратно, интраперитонеальное – 2-кратно с интервалом 14 дней, в дозе 2 мг/0,2 см<sup>3</sup>. Кишечник, мезентериальные лимфатические узлы и внутренние органы (печень и селезенка) павших животных, и животных, подвергшихся через 6 месяцев эвтаназии, исследовали на наличие патологоанатомических и гистоморфологических изменений, а также на микобактериальную колонизацию органов (микроскопия мазков-отпечатков, окрашенных по методу Циль-Нильсена). Для гистологического исследования были отобраны кусочки печени, селезенки, мезентериальных узлов, илеоцекального клапана, подвздошной кишки. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином.

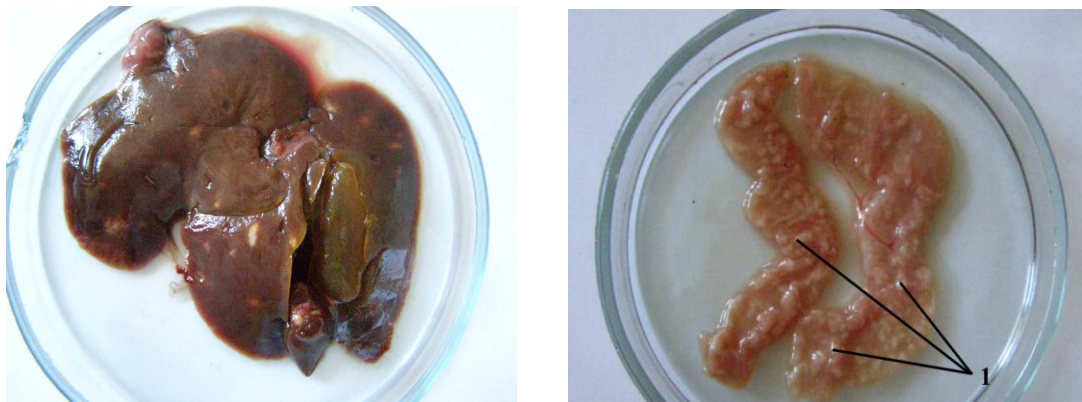
**Результаты исследований.** В результате биологического исследования было установлено, что внутривенное и интраперитонеальное двукратное инфицирование крольчат 1-месячного возраста как референтным штаммом, так и полевой культурой № 5809 индуцирует патологоанатомические и гистоморфологические изменения, характерные для паратуберкулеза КРС. Следует отметить, что при внутривенном заражении через 2–3 месяца наступал летальный исход у 50 % животных, причем за 2–3 дня до смерти у животных появлялись признаки диареи. У остальных крольчат отмечали

уменьшение массы тела, задержку роста, атрофию мышц задних конечностей. При вскрытии у всех, зараженных в 1-месячном возрасте животных, в тонком отделе кишечника, особенно в подвздошной, тощей кишках и илеоцекальном клапане, а также в мезентериальных лимфоузлах отмечали характерные для паратуберкулеза изменения (рис. 1).



**Рис. 1.** Кролик зараженный в/в референтным штаммом *MAP*. Поперечные и продольные борозды в подвздошной (1), ободочной (2) и тощей (3) кишках, мезентериальный узел со светлыми очагами по периферии (4), илеоцекальный клапан с округлым образованием (5)

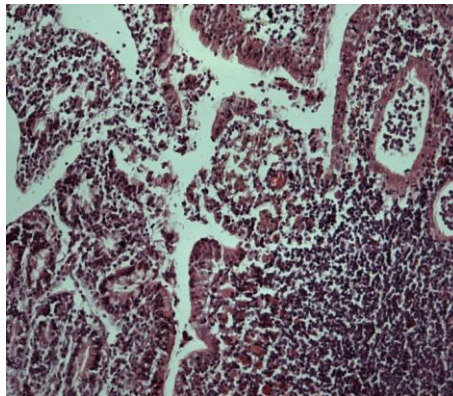
Кишечник был заполнен газами и светло-желтой прозрачной слизью. Стенки кишечника были в 3–4 раза утолщены, отечные, имелись участки с поперечными и продольными не распрямляющимися складками слизистой оболочки. Наибольшие поражения отмечали при заражении полевой культурой № 5809. Так в тонком отделе кишечника выявляли участки с точечными кровоизлияниями и мелкими множественными серо-белыми узелками (рис. 2).



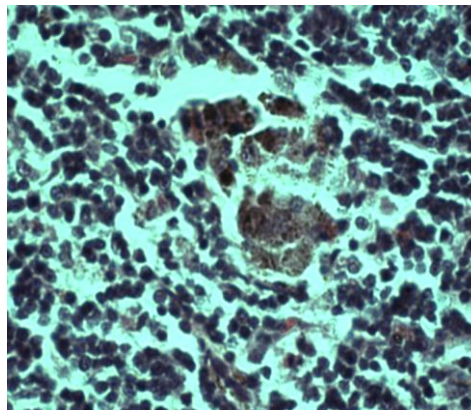
**Рис. 2.** Светлые серозные очаги на печени и милиарные узелки (1) на тощей кишке кролика, зараженного в/в полевой культурой № 5809

Мезентериальные лимфоузлы, печень и селезенка были увеличены. На печени отмечали белые участки, в мезентериальных узлах саркомоподобные очаги (рис. 1, 2). При микроскопии мазков-отпечатков пораженных участков кишечника наблюдали скопления очень мелких палочек и кокковых форм. При посеве биоматериала от животных этой возрастной группы на питательные среды были выделены исходные культуры из легких, селезенки, печени и кишечника. У кроликов, инфицированных в 3-х и 6-ти месячном возрасте, клинических признаков болезни не наблюдали, животные оставались живы до окончания опыта. На вскрытии отмечали увеличение печени и мезентериальных лимфоузлов. Незначительные патологоанатомические изменения, характерные для паратуберкулеза, наблюдали у 50 % животных, инфицированных в 3-х месячном возрасте.

При заражении 1-месячных крольчат референтным штаммом *M. Johnei* и полевой культурой № 5809, независимо от способа инокуляции, гистоморфологические изменения главным образом наблюдали в кишечнике, которые характеризовались деформацией кишечных ворсинок, поражением эпителия, атрофией либеркюновых желез (рис. 3, 4).



**Рис. 3.** Кишечник кролика, зараженного в/в полевой культурой № 5809. Поражения эпителиального слоя, формирование локусов эпителиоидных клеток и макрофагов на верхушках ворсинок Г+Э, ×100



**Рис. 4.** Мезентериальный ЛУ кролика, зараженного и/п референтным штаммом *MAR*. Пораженный участок в мозговом тяже, Г+Е, ×400

При внутривенном инфицировании наблюдалась пролиферация лимфоидных, эпителиоидных, гистиоцитарных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки, а при внутрибрюшинном введении и в подслизистом слое, также выявляли умеренную лимфоидно-гистиоцитарную пролиферацию вокруг сосудов в мышечном слое кишечника. Постоянными были изменения и в мезентериальных лимфатических узлах, которые проявлялись активизацией фагоцитарной активности макрофагов в мозговых тяжах и синусах, и несколько меньше – в корковом веществе. Следует отметить, что наиболее интенсивные патогистологические изменения у кроликов индуцировала полевая культура № 5809 при внутривенном заражении. Как при внутривенном, так и при интраперитонеальном заражении наиболее яркие изменения локализовались на апикальных верхушках кишечных ворсинок под эпителиальным слоем. В таких участках наблюдали единичные макрофаги с захваченными микобактериями паратуберкулеза. В связи с наличием в оболочке микобактерий стеариновых кислот и других воскоподобных веществ фагоцитоз является не завершенным. Пораженные макрофаги были объединены в клеточные скопления, в которых выделяли как активированные клетки, которые были увеличены в размере, цитоплазма занимала большую площадь, имела неровные контуры и четко выраженное ядро, так и клетки, находящиеся в состоянии разрушения. Такие крупные скопления пораженных макрофагов и эпителиоидных клеток локализовались преимущественно в верхушках кишечных ворсинок. В мезентериальных лимфатических узлах они содержались в светлом герминативном центре в виде диффузно расположенных единичных клеток и скоплений, а также формировали цепи на периферии герминативных центров ближе к маргинальной зоне, тяготея в сторону просвета кишечника. Реже встречали в виде единичных клеток в маргинальной зоне, где содержатся преимущественно зрелые лимфоциты. В участках с интенсивным поражением тканей кишечника обнаруживали формирование гигантских клеток. В собственной слизистой (под эпителиальным слоем, между либеркуновыми железами) содержалось большое количество эозинофильных лейкоцитов. При внутривенном заражении они, кроме того, формировали плотные муфты вокруг кровеносных сосудов, то есть происходила интенсивная эмиграция эозинофилов из кровеносного русла в соединительную ткань органа. В подслизистом слое вокруг сосудов формировались лимфоидно-гистиоцитарные скопления.

В опыте на мышах интраперитонеальное инфицирование полевой культурой № 5809 вызывало гибель 70 % животных, пероральное – 50 %. При патологоанатомическом исследовании у всех погибших животных выявляли увеличение печени и селезенки в 2 раза, брыжеечные лимфатические узлы также были увеличены, сочные при разрезе, кишечник наполнен слизью со зловонным запахом.

При микроскопии мазков – отпечатков с пораженных участков тонкого отдела кишечника обнаружены скопления очень мелких кислотоустойчивых палочек. При заражении референтным штаммом мыши оставались живы на протяжении всего опыта. После их эвтаназии при вскрытии отмечали увеличение печени и селезенки, кровенаполнение стенок кишечника. При бактериоскопии мазков – отпечатков со слизистой оболочки кишечника только у 50 % голов были обнаружены кислотоустойчивые палочки.

При гистологическом исследовании кишечника мышей, зараженных референтным штаммом *M. Johnei*, установлено развитие острого катарального энтерита. Отмечали разрушение эпителиального слоя, в просвете кишечника находилось большое количество десквамированных клеток, наблюдалась атрофия либеркуловых желез и кишечных ворсинок. Развивалась интенсивная лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация собственно слизистой, а при интраперитонеальном заражении и подслизистого слоя. Установлено, что референтный штамм *M. Johnei* вызывает менее интенсивные изменения в кишечнике, чем полевая культура № 5809. Также в кишечнике мышей не выявляли скоплений макрофагов и эпителиоидных клеток, как в кишечнике кроликов.

Интраперитонеальное инфицирование морских свинок вызвало гибель только одного животного. Патологоанатомические изменения характеризовались увеличением печени, селезенки и мезентериальных лимфоузлов, участками с точечными кровоизлияниями в кишечнике, газообразованием. У остальных морских свинок характерных патологических изменений не выявляли.

При гистологическом исследовании органов павшей морской свинки, зараженной внутрибрюшинно референтным штаммом *M. Johnei*, установлено, что гистологическое строение печени и селезенки соответствовало норме, в лимфатических узлах содержалось большое количество активированных макрофагов, локализовавшихся в мозговых синусах и тяжах.

**Выводы.** Результаты патологоанатомического и гистологического исследования позволяют утверждать, что крольчата 1-месячного возраста, по сравнению с мышами и морскими свинками, являются наиболее восприимчивыми к возбудителю инфекции и оптимальной моделью воспроизведения паратуберкулеза. Внутривенное инфицирование полевой культуры № 5809 индуцирует более выраженные гистопатологические изменения у кроликов.

*Список литературы*

1. Veazey, R.S. Histopathology of C57BL/6 mice inoculated orally with *Mycobacterium paratuberculosis* [Текст] / R.S.Veazey, H.W.Taylor, D.W. Horohov, J.L. Krahenbuhl, J.L.I.Oliver, T.G.I. Snider // *Journal of Comparative Pathology*. 1995. - № 113. - P. 75–80.
2. Tanaka, S. Reduced formation of granulomata in  $\gamma\delta$  T cell knockout BALB/c mice inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* [Текст] / S. Tanaka, S. Itohara, M. Sato, T. Taniguchi, Y. Yokomizo // *Veterinary Pathology Online*. 2000. - № 37. - P. 415–421.
3. Mutwiri, G.K. Experimental infection of severe combined immunodeficient beige mice with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. [Текст] / G.K. Mutwiri, D.G. Butler, S. Rosendal, J. Yager // *Infection and Immunity*. 1992. - № 60. - P. 4074–4079.
4. Mokresh, A.H. Granulomatous enteritis following oral inoculation of newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin [Текст] / A.H. Mokresh, D.G. Butler, // *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1990. - № 54. - P. 313–319.

**REPRODUCTION OF PARATUBERCULOSIS IN LABORATORY ANIMALS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *M. AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* (MAP)**

**Zavgorodniy A.I., Pozmohova S.A., Girka M.A., Shutchenko P.O., Medvid E.A.**

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

*The aim of the research was to choose the optimal biological model of laboratory animals to reproduce paratuberculosis based on dose, way of infection and the age of the animals.*

*Materials and methods.* For infection there were selected clinically healthy, not previously reacted to tuberculin (PPD) for mammals and birds, guinea pigs, white mice, rabbits of 1, 3 and 6 months of age. Animals were infected with *M. Johnei* reference strains and epizootic culture number 5809 selected from cattle. Guinea pigs were intraperitoneally infected, rabbits – intravenously and intraperitoneally, mice – orally and intraperitoneally. Infection of guinea pigs and rabbits was performed twice, with an interval of 14 days at a dose of 2 mg/sm<sup>3</sup>. Oral infection of mice was performed 3-fold, intraperitoneally – 2-fold with intervals of 14 days, at a dose of 2 mg / 0.2 cm<sup>3</sup>. The presence of pathological and histopathological changes, as well as mycobacterial colonization of organs (Ziehl–Neelsen's method) was investigated in the intestine, mesenteric lymph nodes, liver and spleen. For histological examination preparations were stained with hematoxylin-eosin.

*Results.* As a result the biological study it was found that the most sensitive to paratuberculosis pathogen are 1-month rabbits. So intravenous and intraperitoneally double infection of rabbits 1-month old with reference strains and № 5809 field culture induces histomorphological and pathological changes characterized for cattle paratuberculosis. The most pronounced pathological and histomorphological changes were observed after intravenous infection with № 5809 field culture. At 3-month rabbits induction the characteristic pathological changes was succeeded in 50 % of infected animals, 6-month-old rabbits showed no signs of illness during the entire period of observation. At mice induction the development of acute catarrhal enteritis, lymphoid-histiocytic infiltration of the intestine, desquamation of the epithelium, atrophy of glandulae Lieberkuehnianae and intestinal villi was successfully performed. However, due to the size of the animal pathological changes in mice are less

evident, in addition to these animals, unlike rabbits showed no accumulation of macrophages and epithelial cells. Guinea pigs were resistant to paratuberculosis pathogen.

**Conclusions.** The results of postmortem and histological studies suggest that rabbits of 1 months of age, compared with mice and guinea pigs are most susceptible to the pathogen and the optimal model for paratuberculosis reproduction. Intravenous infection with № 5809 field culture induces more pronounced histopathological changes.

**Keywords:** biological model, paratuberculosis reproduction, laboratory animals, methods of infection, pathological and histopathological changes.

УДК 619: 616.98: 578.832.1А: 578.831.11: 616 – 078:59.083.33:568.2(477.7)

## ДОСЛІДЖЕННЯ ДИКИХ ПТАХІВ ЦЕНТРАЛЬНОГО ПРИЧОРНОМОР'Я ЩОДО НАЯВНОСТІ АНТИТІЛ ДО ОРТОМІКСОВІРУСІВ І ПАРАМІКСОВІРУСУ 1 СЕРОТИПУ

Стегній Б.Т., Музика Д.В., Стегній А.Б., Рула О.М., Ткаченко С.В., Майорова К.Ф., Кошелєв В.В., Колесник О.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

**А. Харитх Абдулла**

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

*У статті наведені дані проведення імунологічних досліджень серед диких птахів центрального Причорномор'я та надано результати аналізу епізоотологічної ситуації щодо наявності антитіл до ортоміксовірусів і параміксовірусу 1 серотипу в екстрактах жовтків яєць та сироваток крові.*

**Ключові слова:** грип птиці, ньюкаслська хвороба, сироватки крові, екстракти жовтків яєць, дикі птахи.

Пташиний грип – особливо небезпечне вірусне захворювання птахів, що викликається одним з штамів вірусу грипу типу А. Грип птиці віднесено до списку особливо небезпечних захворювань МЕБ [5].

Мігруючі водоплаваючі птахи (найчастіше дикі качки) є природним резервуаром вірусу пташиного грипу та причиною заносу інфекції у пташину господарства. Разом з тим в силу природної резистентності ці птахи менше всього сприйнятливі до інфекції та можуть подолати у процесі міграції значні відстані. Особливо сприйнятливі до грипу кури та індички.

Параміксовірус 1 (ПМВ-1) серотипу викликає у птахів хворобу Ньюкасла (ND), яка розповсюджена в усьому світі та призводить до великих економічних збитків у птахівництві [1, 2]. Вірус хвороби Ньюкасла (NDV) здатний заразити більше 240 видів птахів, поширюється в основному через прямі контакти між інфікованими та здоровими птахами [3].

ПМВ-1 є єдиним добре охарактеризованим серотипом серед параміксовірусів, через високу захворюваність, смертність та економічні збитки. NDV ізоляти сильно розрізняються за своєю патогенністю для курчат, починаючи від неявної хвороби до важких респіраторних і неврологічних захворювань, які викликають 100 % смертність [4].

Хвороба Ньюкасла є небезпечною інфекційною хворобою серед домашніх птахів і тому випадки її спалахів мають бути доведені до Всесвітньої організації з охорони здоров'я тварин (МЕБ) [5].

З огляду на вищезазначене стає зрозумілим необхідність постійного моніторингу збудників вірусу грипу та ньюкаслської хвороби для своєчасного реагування та запобігання їх розповсюдженню у випадках спалахів даних захворювань на території України.

**Мета роботи:** провести імунологічні дослідження диких птахів центрального Причорномор'я, визначити наявність антитіл до ортоміксовірусів підтипів Н1–Н14 і параміксовірусу 1 серотипу в жовтку яєць та сироватках крові.

**Матеріали та методи.** Для проведення серологічних досліджень у місцях скупчення дикої птиці на території центрального Причорномор'я було відібрано проби біологічного матеріалу від 8 видів птиці. Проби крові відбирали від побережника чорногрудого (*calidris alpina*) у Джанкойському р-ні поблизу с. Єрмакове (АР Крим), від коловодника звичайного (*tringa totanus*) і кулика-сороки (*haematopus ostralegus*) поблизу с. Придорожнє.

Яйця від мартина тонкодзьобого (*larus genei*), чайки (*larus*) і чоботаря (*recurvirostra avosetta*) відібрали у Джанкойському р-ні поблизу с. Яснополянське (АР Крим).

Відбір крові від дикої птиці проводили згідно до загальноприйнятих методик, рекомендованих МЕБ з підкрильцевої або з яремної вени, для подальшого отримання сироватки крові [5].

Екстракти жовтків яєць готували за методикою, яка передбачала: ретельне змішування жовтка з фізіологічним розчином у співвідношенні 1:1, додавання до цієї суміші рівного об'єму хлороформу, шутелювання протягом 5–10 хвилин і центрифугування при 3000 об/хв. 15 хвилин [6].

Для проведення серологічних досліджень сироваток крові та екстрактів жовтків використовували «Тест-систему для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1-Н14 в реакції затримки