

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**



**СУЧАСНІ АСПЕКТИ ЛАБОРАТОРНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ПАРАТУБЕРКУЛЬОЗУ У
ЖУЙНИХ ТВАРИН**

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Київ – 2024

Методичні рекомендації розглянуто та затверджено на засіданні Вченої ради Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол № 4 від 12.07.2024 р.).

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику державних лабораторій Держпродспоживслужби Науково-методичною радою при Державній службі України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № 6 від 23.09.2024 р.).

Розробники: Піщанський О.В. канд. вет. наук, Алексеєва Г.Б. канд. вет. наук, Пискун А.В. канд. вет. наук, Кравцова О.Л., Поліщук О.Д., Пискун О.О. канд. вет. наук, Метолапова Г.М.

Рецензенти:

Корнієнко Л.Є. – доктор ветеринарних наук, професор, головний науковий співробітник науково-дослідного епізоотологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи;

Бологін В.І. – кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник, в.о. директора Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Сучасні аспекти лабораторної діагностики паратуберкульозу у жуйних тварин: методичні рекомендації; О.В. Піщанський, Г.Б. Алексеєва, А.В. Пискун, О.Л. Кравцова, О.Д. Поліщук, О.О. Пискун, Г.М. Метолапова; Київ, ДНДІЛДВСЕ; 2024; 52 с.

У методичних рекомендаціях представлені дані щодо актуальності та аспектів лабораторної діагностики паратуберкульозу у жуйних тварин.

Методичні рекомендації призначені для спеціалістів регіональних, міських, районних та міжрайонних державних лабораторій Держпродспоживслужби, лікарів ветеринарної медицини, наукових співробітників науково-дослідних установ, слухачів факультетів післядипломного навчання, викладачів та студентів вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації зі спеціальності «Ветеринарна медицина».

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень та скорочень	4
Вступ	5
I. Актуальність проблематики, пов'язаної з паратуберкульозом тварин у світі та, зокрема, в Україні	6
1.1 Характеристика збудників паратуберкульозу	6
1.2 Епізоотологічні дані	7
1.3 Патогенез	9
1.4 Клінічні ознаки	9
1.5 Патолого-анатомічні зміни	10
1.6 Діагностика	11
1.7 Профілактика	13
1.8 Заключення	14
II. Методи лабораторної діагностики паратуберкульозу у тварин	15
2.1 Бактеріологічні методи досліджень	15
2.1.1 Підготовка біологічного матеріалу до випробування	15
2.1.2 Бактеріологічний метод діагностики	18
I. Мікроскопія мазків	18
II. Виділення чистої культури мікобактерій	21
III. Постановка біопроби	23
2.2 Молекулярно-генетичні методи досліджень	23
2.3 Серологічні методи досліджень	24
2.3.1 Методика постановки реакції зв'язування комплементу (РЗК)	24
2.3.2 Постановка методу імуноферментного аналізу (ІФА).....	33
2.3.3 Методика постановки реакції імунодифузії в агаровому гелі (РІД) ..	37
2.4. Шкірний тест на паратуберкульоз	38
2.5. Гама-інтерферон тест	39
Список використаної літератури	41
Додаток А	45
Додаток Б	46
Додаток В	49
Додаток Г	50
Додаток Д	51

Перелік умовних позначень та скорочень

бТВ – туберкульоз ВРХ;

НРС – гексадецилпирідіум хлорид;

LAMP – петлева ізотермічна ампліфікація;

MAP – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*;

PPD – очищений білок похідна (purified protein derivative);

РТВ – паратуберкульоз;

VAN – суміш ванкоміцину, амфотерицину та налідиксової кислоти;

IFN- γ – гама-інтерферон;

ВООЗт (WOAH) – Всесвітня організація охорони здоров'я тварин;

ГПТ – гіперчутливість повільного типу;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

ІФА (ELISA) – метод імуноферментного аналізу;

м.о. – мікроорганізми;

РЗК (CFT) – реакція зв'язування комплекменту;

РІД (AGID) – реакція імунодифузії в агаровому гелі.

ВСТУП

Паратуберкульоз, також відомий як паратуберкульозний ентерит та хвороба Йоне (від англ. Johne's disease) – хронічне, контагіозне захворювання ШКТ, збудник якого *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) переважно вражає різні види жуйних (лат. *Ruminantia*) тварин. У хворі ВРХ та ДРХ головним чином відмічають повільну втрату ваги та прогресуючу діарею, що, у свою чергу, призводить до втрати молочної та м'ясної продуктивності.

Відповідно до даних сучасних наукових літературних джерел, MAP може інфікувати також і людей, проте його вплив на організм людини залишається невивченим і дискусійним. Зокрема, описується зв'язок між паратуберкульозом та хворобою Крона (хронічного захворювання ШКТ) і цукровим діабетом 1-го типу. Спроби з'ясувати такий зв'язок стимулюють розроблення програм контролю і профілактики, які можуть бути корисними не лише для аграрного сектору, але й для громадського здоров'я.

Хоча паратуберкульоз був вперше описаний понад 100 років тому, це захворювання досі залишається досить широко поширеним у країнах Європи (зокрема реєструється і в Україні), Північної Америки, Південної Америки, Азії, Австралії та Африки і завдає значних економічних збитків. Цьому сприяє той факт, що значна частина поголів'я після інфікування стає безсимптомними хронічними носіями збудника, а клінічні ознаки захворювання можуть з'являтися лише через кілька років. Тому, за відсутності моніторингових лабораторних досліджень, MAP може циркулювати непоміченим у стаді роками. До того ж, необхідно враховувати диференційний діагноз від туберкульозу ВРХ (bTB) та відсутність специфічних заходів лікування.

Враховуючи все вищезазначене, паратуберкульоз занесений до переліку хвороб, що підлягають обов'язковій звітності до Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин (ВООЗт), що зазначено у «Кодексі здоров'я наземних тварин».

I. Актуальність проблематики, пов'язаної з паратуберкульозом тварин у світі та, зокрема, в Україні

1.1. Характеристика збудників паратуберкульозу

Етіологічним фактором паратуберкульозу є бактерія *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Це кислотостійка паличка в комплексі організмів *M. avium*, що належить до родини *Mycobacteriaceae*, порядку *Actinomycetales*. Попередні назви цього мікроорганізму були *Mycobacterium paratuberculosis* та *M. Johnei* [1].

MAP має товсту, воскоподібну клітинну стінку, що на 60 % складається із ліпідів. Така структура сприяє кислотостійкості, гідрофобності і стійкості мікроорганізму до хімічного (дія хлору) і теплового (пастеризація) впливу. Товста стінка також обмежує поглинання поживних речовин, через що мікобактерії дуже повільно ростуть і, як наслідок, їх важко культивувати [27].

За можливістю інфікування різних сприйнятливих господарів, штами збудника розділені на два типи. Так, штами типу II (також відомі як тип C) спочатку ідентифікували у ВРХ, але нині вони мають широкий спектр носіїв, який включає овець, кіз, верблюдів, а також нежуйних диких тварин [17]. Штами типу I (тип S) виявляються головним чином у ДРХ, проте їх все частіше реєструють у інших видів, включаючи оленів, верблюдів, альпаків, а також у ВРХ, яка знаходиться у безпосередньому контакті із ДРХ [23]. Штами типу III були окремою «проміжною» групою, але зараз вони вважаються підтипом типу I [8, 9].

Крім того, відповідно до даних молекулярно-генетичних досліджень, існують два різних екзотичних штами «бізонових типів (B)» – один у Північній Америці, а інший у Азії. Останній був ізольований від ВРХ, буйволів, овець, кіз, оленів, бізонів, кроликів, диких свиней і є переважаючим штамом у азіатському регіоні [1].

1.2. Епізоотологічні дані

Найчастіше паратуберкульоз (РТВ) реєструється серед домашніх жуйних тварин (ВРХ, ДРХ, верблюдов, буйволів тощо), що виступають головними резервуарами інфекції. Це захворювання вважається одним із найбільш актуальних для ВРХ по всьому світу. Проте, збудника *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ізолювали також від значної кількості диких тварин, а саме: лосів, північних оленів (*Rangifer tarandus*), бізонів (*Bison bison*), товсторогих баранів (*Ovis canadensis*), сніжних кіз (*Oreamnos americanus*) та різних видів антилоп [1].

Крім того, відповідно до даних ВООЗт, сприйнятливими до МАР є багато видів ссавців, що не належать до жуйних, та навіть деякі види птахів (табл. 1) [1, 29].

Таблиця 1

Перелік сприйнятливих до збудника паратуберкульозу видів нежуйних тварин (за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин)

Ссавці				
Кролі	Коні	Горностаї	Мангусти	Єноти
Зайці	Свині	Видри	Борсуки	Койоти
Собаки	Дикі свині	Ласки	Скунси	Опосуми
Коти	Лисиці	Куниці	Ведмеді	Примати
Гризуни	Сумчасті	Землерийки		
Птахи				
Галки	Граки	Ворони	Шпаки	Горобці
Чайки				

Ці «нетипові» господарі інфікуються через поїдання інфікованої здобичі або через контакт із хворими тваринами і, відповідно до сучасних уявлень, вважаються «глухим кутом» інфекції (МАР у них не виділяється із фекаліями чи молоком, щоб створити ризик передачі) [4].

Окремо із наведених вище тварин необхідно виокремити європейських кроликів, які, відповідно до даних літературних джерел, можуть відігравати одну із провідних ролей у поширенні паратуберкульозу серед свійських жуйних

тварин та виступати провідним джерелом збудника у певних регіонах (зокрема, у Шотландії) [4, 9].

Сприйнятливою до MAP є також і людина, проте зоонозний потенціал хвороби потребує подальшого вивчення. Так, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* інколи виявляється в кишковому тракті деяких здорових людей [10, 31]. Вважається також, що цей мікроорганізм відіграє роль у спричиненні хвороби Крона (хронічного захворювання ШКТ невідомої етіології). Існують докази як на користь, так і проти цієї гіпотези, а причинна роль наразі не доведена [25]. Також є ряд наукових статей щодо можливості відігривання певної ролі паратуберкульозу у виникненні або прогресуванні ряду інших захворювань, таких як: саркоїдоз, цукровий діабет типів 1 і 2, розсіяний склероз, ВІЛ, тиреоїдит Хашимото [11, 12, 26]. Найбільш послідовні докази можливого зв'язку описані з хворобою Крона та цукровим діабетом 1 типу. Для інших захворювань будь-яка роль на даний момент виглядає спекулятивною.

MAP – облигатний патоген тварин. Єдине місце, де ці збудники можуть розмножуватися, це клітини-макрофаги. Коли MAP виділяються у навколишнє середовище із фекаліями, молозивом або молоком, вони можуть виживати впродовж тривалого часу (до року) у ґрунті та воді. Основний шлях передачі – аліментарний (особливо, фекально-оральний), проте описані також випадки вертикальної передачі збудника [32].

Відповідно до даних ВООЗт, паратуберкульоз широко поширений у всьому світі. Лише Швеція та деякі штати Австралії наразі підтвердили відсутність випадків паратуберкульозу на своїх територіях [1, 29]. Щодо Європи, то станом на 2022 рік було проведено масштабний аналіз офіційної звітності по діагностичній і профілактичній роботі за останні 24 роки та встановлено, що найчастіше MAP реєструвалися у країнах південної і західної Європи. У 65 % країн РТВ оголошено захворюванням, яке підлягає реєстрації, проте лише у 19 % з них регулярно впроваджується активний моніторинг за захворюванням [14]. При цьому, до 2017 року 57.44 % країн Європи, де реєструвався паратуберкульоз, класифікувалися як ензоотичні щодо нього [15].

На території нашої держави також реєструються спорадичні випадки паратуберкульозу серед свійських жуйних тварин [34].

1.3. Патогенез

Сприйнятлива тварина проковтує МАР, звідки він проникає в стінку кишківника через епітелій. Далі мікобактерії індукують захворювання шляхом стимулювання нерегульованої запальної реакції, яка підтримується неадаптивною імунною відповіддю. Там МАР захоплюються кишковими макрофагами і існують у формі сферопласту (без клітинної стінки) в латентному або непатогенному стані роками. Потрапляючи всередину макрофага, мікобактерія викликає утворення ряд медіаторів запалення, в тому числі цитокінів (TNF-а, інтерлейкін (IL)-1 тощо). Вони разом із Т-лімфоцитами спричиняють пошкодження тканин кишківника, що і спричиняє прогресуючу діарею [27, 28].

1.4. Клінічні ознаки

Інкубаційний період паратуберкульозу триває від місяців до років. Зокрема, у ВРХ він може тривати впродовж 2–5 років (описані випадки навіть до 15 років). Раніше клінічні ознаки можуть проявлятися у дрібних жуйних і верблюдових [1].

Паратуберкульоз зазвичай проявляється спорадичними клінічними випадками у більшості видів, включаючи ВРХ та ДРХ, часто вражаючи навіть молодняк.

У ВРХ основними клінічними проявами є діарея (часто із домішками крові, слизу чи епітелію) і виснаження. Початкові симптоми можуть бути мало помітними та обмежуватися втратою ваги і зменшенням молочної продуктивності [24]. Спочатку діарея може бути періодичною, але протягом тижнів або місяців вона стає постійною і прогресуючою. Тенезми не виявляються. У деяких випадках може розвиватися підшкірний набряк, особливо піднижньощелепний та/або вентральний набряк, внаслідок зниження концентрації білка в плазмі. Температура тіла та апетит зазвичай в межах

норми. Із прогресуванням хвороби тварини стають все більш виснаженими і зазвичай гинуть із термінальною кахексією та зневодненням [16].

Хоча клінічні ознаки загалом схожі у всіх жуйних, у ДРХ можуть бути деякі відмінності, що головним чином пов'язані зі ступенем прояву діареї. Вона зустрічається рідше і є періодичною. Втрата ваги та непереносимість фізичних навантажень є характерними ознаками у овець і кіз. Уражені тварини, як правило, ходять в кінці отари. У деяких дрібних жуйних спостерігається піднижньощелепний набряк, а шерстяний покрив часто пошкоджений і линяє. Повідомляється, що анемія також є поширеною [19, 29, 33].

У інших видів тварин клінічні ознаки потребують подальшого вивчення, проте в цілому вони є подібними до таких у ВРХ та ДРХ [1].

1.5. Патолого-анатомічні зміни

Трупи хронічно хворих тварин зазвичай виснажені та можуть мати залежний набряк і/або рідину в порожнинах тіла.

Характерною ознакою у ВРХ є потовщена, часто гофрована стінка кишківника (найбільш виражена в дистальному відділі тонкої кишки). У деяких випадках ураження можуть поширюватися до товстої кишки. Слизова оболонка кишківника зазвичай без виразок. Мезентеріальні та регіонарні лімфатичні вузли часто збільшені та набряклі, а субсерозні лімфатичні вузли, як правило, помітні. Ураження зазвичай відсутні або незначні у субклінічних носіїв, а іноді вони відсутні або мінімальні у клінічних випадках.

У овець уражені ділянки кишківника часто лише злегка потовщені і можуть виглядати незміненими навіть у хворих тварин. Деякі штами типу I (S) *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, які частіше зустрічаються у овець, ніж у ВРХ, продукують пігмент, який забарвлює кишкові ураження у жовтий або коричнево-жовтий колір. Казеїноподібні або кальцифіковані вогнища іноді виявляють у кишківнику та пов'язаних з ними лімфатичних вузлах овець та кіз. Кози можуть мати ураження, подібні до овець, з незначним потовщенням кишкової стінки. Однак є також повідомлення про природно інфікованих кіз із

серйозними дифузними кишковими ураженнями, які особливо виражені в проксимальному відділі тонкої кишки. У деяких із цих тварин відмічалось потовщення стінки кишківника з гіперемією, виразками та фібринозним ексудатом, а також фіброзні перитонеальні спайки та стриктури кишечника в деяких випадках [16, 28, 33].

1.6. Діагностика

Для діагностики паратуберкульозу застосовують прижиттєвий та посмертний методи. До прижиттєвих методів належать алергічний, мікроскопічний, серологічний та молекулярно-генетичний (дослідження змивів зі слизових оболонок та біологічних рідин і секретів). До посмертного – гістологічний, бактеріологічний та молекулярно-генетичний (дослідження патологічного матеріалу) методи. Ефективність застосування цих методів залежить від стадії захворювання.

Фарбування за Цілем-Нільсеном можна застосовувати для діагностики в клінічних випадках. Скупчення дрібних сильно кислотостійких мікроорганізмів у фекаліях вказують, що симптоми можуть бути викликані МАР. Мікроорганізми також можуть бути виявлені в мазках зі слизової оболонки кишечника або поверхонь розрізів лімфатичних вузлів. У зразках від деяких інфікованих тварин мікобактерії можуть бути рідкісними або взагалі відсутніми. Гістопатологія також може допомогти в діагностиці. Методи імунного фарбування можуть виявити м.о. у зразках тканин, але антитіла можуть реагувати перехресно з антигенами від інших мікобактерій [29].

МАР або його нуклеїнові кислоти можна виявити в фекаліях, кишкового тракту та асоційованих лімфатичних вузлах під час розтину трупа. Зазвичай рекомендовані зразки для посіву включають клубову кишку, мезентеріальні та ілеоцекальні лімфатичні вузли та печінку, хоча мікроорганізм також може бути виявлений і в інших тканинах. Також для виявлення неблагополучних стад можна досліджувати молоко та проби із навколишнього середовища.

M. avium subsp. *paratuberculosis* може рости на ряді спеціалізованих поживних середовищ, але деякі штами, зокрема ті, що належать до типу I (S), важче виділити. Встановлено, що ряд штамів типу I і типу II ростуть на середовищах Middlebrook 7H10 і 7H11 з мікобактином J, хоча деякі з них не ростуть на інших широко використовуваних середовищах. Тому, пропонується культивувати ці м.о. на кількох середовищах. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* розвивається повільно, і залежно від штаму та культурального середовища результати можуть бути одержані впродовж кількох тижнів або місяців.

Досить ефективно зарекомендували себе методи молекулярно-генетичних досліджень, особливо ПЛР та петлева ізотермічна ампліфікація (Loop mediated isothermal amplification, LAMP). Спеціалізовані генетичні методи, такі як електрофорез в імпульсному полі, корисні для епідеміологічних досліджень і дозволяють розрізняти штами типів I та II [5].

Внутрішньошкірна проба із туберкуліном на основі очищених білків *M. avium* subsp. *paratuberculosis* або *M. avium* дозволяє виявляти реакції гіперчутливості повільного типу (ГПТ), однак цей тест є недостатньо чутливим і часто виникають неспецифічні реакції.

Серологічні методи досліджень можуть бути корисними для скринінгової діагностики та для підтвердження діагнозу у тварин із клінічними ознаками. Так, доступні імуноферментні тест-системи (ІФА, ELISA), що є більш чутливими і дозволяють ефективніше виявляти субклінічно інфіковану ВРХ та ДРХ. У той же час, реакція зв'язування комплементу (РЗК, CFT) та реакція імунодифузії в агаровому гелі (РІД, AGID) є досить ефективними для ідентифікації клінічних випадків захворювання [19–21].

Однак, не дивлячись на велику кількість доступних методів серологічної діагностики, вона ускладнена через те, що титри антитіл у інфікованих тварин розвиваються досить повільно: зазвичай вони з'являються у сироватці через 10–17 місяців після зараження, але може знадобитися і більше часу [1, 19].

Щодо диференційної діагностики, в першу чергу за постановки діагнозу на паратуберкульоз слід виключити туберкульоз, аліментарні ентерити,

гельмінтози, кокцидіоз і недостатність міді. Туберкульоз виключають алергічним дослідженням і біопробою. Крім того, туберкульоз кишечника характеризується здебільшого виразковими ураженнями кишкової стінки й утворенням у брижових лімфатичних вузлах вогнищ із сирнистим або обвапнованим вмістом, оточених грануляційною тканиною з епітеліоїдних, лімфоїдних і гігантських клітин. Мікроскопією мазків за методом Ціля-Нільсена у вмісті вогнища виявляють поодинокі червоні палички. Гельмінтози (стронгілоїдоз і кокцидіоз) диференціюють копрологічним дослідженням. Крім того, враховують, що стронгілоїдозом хворіють здебільшого молоді тварини і можливе одночасне перехворювання паратуберкульозом і стронгілоїдозом; для кокцидіозу притаманний кривавий пронос, хвороба триває від двох до семи діб, сприйнятливі телята у віці до двох років. Для виключення аліментарних ентеритів враховують результати даних анамнезу і симптоматичного лікування, також відсутність проліфератів з епітеліоїдних клітин у стінці кишки і лімфатичних вузлах. За недостатності міді відмічають випадіння волосу навколо очей і некоординованість рухів унаслідок атаксії. Симптоми недостатності Купруму зникають після введення в раціон солей цього мікроелементу [6, 37].

1.7. Профілактика

Заходи боротьби включають дотримання санітарних норм та адміністративний контроль, що полягає у постійних моніторингових дослідженнях та усунення зі стада інфікованих тварин.

У стадах, уражених паратуберкульозом, телята, козенята або ягнята повинні народжуватися у спеціально підготовлених прибраних приміщеннях та утримуватися окремо від дорослих принаймні до однорічного віку. Перед згодовуванням молодняку молозива його необхідно піддати пастеризуванню впродовж однієї год за температури 56–59 °С. Такий підхід значно зменшує ймовірність передачі збудника цій найбільш вразливій групі тварин. Крім того,

необхідно проводити постійні прибирання у місцях утримання тварин для запобігання потрапляння фекалій у ємності із водою та їжею.

Розроблено ряд вакцин, однак вони використовуються лише у дуже чітко визначених ситуаціях і під суворим регуляторним контролем лише у деяких країнах, оскільки вакцинація може перешкоджати програмам ліквідації, які базуються на виявленні та подальшому вилученні інфікованих тварин (тяжко диференціювати інфікованих тварин від вакцинованих) [7]. Враховуючи вищезазначене, в Україні вакцинація від паратуберкульозу тварин не проводиться.

Згідно з даними літературних джерел найчастіше для дезінфекції від представників комплексу MAP є гідроксид натрію, діоксид хлору, етиленоксид, 0,35 % р-н надоцтової кислоти та ортофталевий альдегід [18, 22, 29].

1.8. Висновки

Враховуючи те, що в Україні реєструються спорадичні випадки паратуберкульозу, а збудник характеризується глобальним поширенням у світі, має широкий діапазон сприйнятливих до нього тварин та людини, а також беручи до уваги складність проведення ефективних діагностичних досліджень, актуальність лабораторної діагностики цього захворювання для нашої держави залишається на досить високому рівні та входить до переліку захворювань державного моніторингу.

II. МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПАРАТУБЕРКУЛЬОЗУ У ТВАРИН

Діагноз на паратуберкульоз ставиться комплексно і включає в себе діагностику клінічних випадків захворювання та виявлення субклінічної інфекції. Останній необхідний для контролю хвороби як в окремому господарстві, так і на національному чи міжнародному рівнях.

Нині не розроблено жодного діагностичного методу, який би мав 100 % чутливість та специфічність як у субклінічних, так і у клінічних випадках [29]. Реєстрація субклінічної інфекції головним чином залежить від виявлення специфічних антитіл серологічними методами, індикації збудника MAP із фекалій, молока або тканин, зібраних під час розтину, виявлення ДНК методом ПЛР або демонстрації клітинно-опосередкованих реакцій (ГПТ). Вибір тесту залежить від мети і ступеня чутливості та специфічності, необхідних на рівні дослідження окремої тварини чи стада в цілому (Додаток А).

2.1. Бактеріологічні методи досліджень

2.1.1. Підготовка біологічного матеріалу до випробування

Перед проведенням бактеріологічних досліджень патологічний матеріал піддають спеціальній обробці, мета якої полягає в знищенні сторонньої мікрофлори і концентрації мікобактерій у невеликому об'ємі.

1. *Внутрішні органи й лімфатичні вузли* подрібнюють (ножицями) на невеличкі шматочки, які розтирають у стерильній ступці із додаванням стерильного битого скла або піску, заливають 3–5 % розчином сірчаної або 5–10 % розчином щавлевої кислоти у співвідношенні 1:4, фільтрують через два шари стерильної марлі і центрифугують за 3000 об/хв. впродовж 10–15 хв. Надосадову рідину зливають, осад двічі-тричі відмивають фізіологічним розчином (шляхом центрифугування) і використовують для виготовлення мазків та проведення посівів з метою виділення чистої культури збудника.

2. *Метод розщеплення/осадження для деконтамінації тканин.* Приблизно 4 г слизової кишківника або 4 г подрібнених лімфатичних вузлів помістити в стерильний посуд для гомогенізації та додати 50 см³ трипсину (2,5 % розчин). Суміш нейтралізувати 4,0 % NaOH, перемішувати впродовж 30 хв за кімнатної температури, використовуючи магнітну мішалку. Розщеплену суміш фільтрувати через марлю. Фільтрат центрифугувати за 2000–3000 об/хв впродовж 30 хв. Надосадову рідину злити, осад перенести в 20 см³ 0,75 % розчину НРС (гексадецилпирідіум хлориду) і дати відстоятися впродовж 18 год за кімнатної температури. Частинки, що осідають на дно пробірки, слід використовувати як інокулум і видалити піпеткою, не торкаючи надосадову рідину. Як альтернативу можна використовувати інші методи деконтамінації, наприклад, обробку 5 % розчином щавлевої кислоти.

3. *Метод подвійної інкубації для деконтамінації тканин.* Близько 2 г дослідного зразка (очищеного від жиру) нарізати тонко, використовуючи стерильне лезо скальпеля або ножиці, і гомогенізувати впродовж 1 хв у 25 см³ 0,75 % розчину НРС. Дозволити зразку відстоятися, щоб зникла піна та великі шматочки тканини випали в осад. Обережно помістити гомогенат тканини у центрифужну пробірку, щоб до останньої не потрапив жир і великі шматочки тканини. Відстояти впродовж 30 хв, потім перенести 10 см³ суспензії, взятої безпосередньо над осадом, у 30 см³ пробірку та інкубувати протягом 3 год за температури 37°C. Центрифугувати впродовж 30 хв за 900 об/хв, видалити надосадову рідину та ресуспендувати в 1 см³ суміші антибіотиків, що містить по 100 мкг ванкоміцину, амфотерицину та налідиксової кислоти (VAN). Інкубувати впродовж ночі за температури 37 °C. Використовувати суспензію для посіву на середовища.

4. *З молока* за допомогою центрифугування (3000 об/хв впродовж 20–30 хв) одержують осад, який обробляють 3–6 % розчином сірчаної кислоти, 20–30 хв ретельно збовтують та центрифугують 10–15 хв за 3000 об/хв, двічі-тричі відмивають фізіологічним розчином і використовують для дослідження.

5. *Бронхіальний і вагінальний слиз* змішують у співвідношенні 1:1 із 10 % розчином тризаміщеного фосфату натрію, перемішують і ставлять у термостат на 24 год. Для досліджень використовують осад, одержаний центрифугуванням за 3000 об/хв впродовж 10–15 хв.

6. Приготування зразків із *фекальних мас та зразків, відібраних із об'єктів зовнішнього середовища (грунт, підстилка, зіскрібки з годівниць та стін, вода, корми)*. Поміщають 1,0 г дослідних зразків у стерильні флакони ємністю 50 см³, заливають стерильною дистильованою водою у співвідношенні 1:4 та залишають на 2 год за кімнатної температури. Верхній шар відстояного у стерильній дистильованій воді дослідного зразку у кількості 5,0 см³ вносять на дно флакону із 25 см³ 0,9 % розчину N-цетилпіридинія хлористого. Флакони закривають стерильними гумовими пробками та залишають за кімнатної температури на 18–24 год (для зразків силосу на 48 год). Після експозиції для подальшого посіву використовують матеріал із дна флакону.

7. Підготовка до випробування фекальних мас.

7.1 Фекальні маси гомогенізують у ступці з 18 % розчином сірчаної кислоти, фільтрують через стерильну марлю, центрифугують. Відмитий фізіологічним розчином осад використовують для виготовлення мазків та посівів на живильні середовища.

7.2 Гомогенізують 2–4 г фекалій шляхом розтирання у ступці і розбавляють насиченим розчином натрію хлориду до утворення маси рідкої консистенції. Залишають на 4 год у ШББ, потім необхідно профільтрувати через кілька шарів марлі, 3–5 см³ фільтрату внести у центрифужну пробірку і додати 1 см³ петролейного ефіру, добре струсити і центрифугувати впродовж 15–25 хв за 3000 об/хв. З матеріалу, взятого із нижньої частини верхнього шару, виготовляють мазки.

7.3 Фекалії розтирають у ступці, змішують з 10 частинами 5 % розчину щавлевої кислоти, ретельно струшують, поміщають на водяну баню за температури 37 °С на 20–30 хв, потім центрифугують за 2500–3000 об/хв

впродовж 15 хв. Надосадову рідину видаляють, осад промивають стерильним фізіологічним розчином і здійснюють посів на живильні середовища.

7.4 Суспендування та деконтамінація фекалій. Перенести 1 г фекалій у 50 см³ пробірку, що містить 20 см³ стерильної дистильованої води. Суміш струшувати впродовж 30 хв за кімнатної температури. Частинкам більшого розміру дозволити осісти впродовж 30 хв. Верхній шар фекальної суспензії у кількості 5 см³ перенести в 50 см³ пробірку, що містить 20 см³ хлорид гексадецил піридинія. Пробірку кілька разів струсити для одержання однорідного вмісту і залишити впродовж 18 год за кімнатної температури.

8. *Концентрацію мікобактерій у досліджуваному матеріалі здійснюють також методом флотації.* Гомогенізований до пастоподібного стану у ступці матеріал із додаванням фізіологічного розчину (10 см³) поміщають у вузькогорлу колбу, місткістю 250 см³, додають таку ж кількість 1 % розчину гідрооксиду натрію та гомогенізують до однорідної консистенції. Матеріал розводять дистильованою водою у співвідношенні 1:9, додають 1–2 см³ ксилолу. Суміш струшують впродовж 5–10 хв, додають дистильовану воду до вузького перехвату колби і залишають на 30 хв за кімнатної температури. Мікобактерії спливають і концентруються у верхньому шарі рідини, яку і використовують для досліджень.

2.1.2. Бактеріологічний метод діагностики

Бактеріологічний метод діагностики паратуберкульозу включає три основні етапи: мікроскопію мазків із підготовленого матеріалу, виділення чистої культури мікобактерій та постановку біопроби (остання не має широкого застосування) (Додаток Д).

I. Мікроскопія мазків

Із біологічного матеріалу (слиз, фекалії тощо) готують 4–6 мазків, які фарбують методом Ціля-Нільсена та переглядають не менше 50 полів зору мікроскопа за імерсійного збільшення у 1000 разів (100 x 10).

1.1. *Виготовлення препаратів-мазків зі щільного (густого) клінічного матеріалу або із культури на твердому середовищі.* Знежирене предметне скельце проводять через полум'я газового пальника і після охолодження кладуть на робоче місце. На центр скельця бактеріологічною петлею наносять краплю фізрозчину. Досліджуваний матеріал (або культуру) наносять на скло біля краплі фізрозчину і, поступово розтираючи його в краплі, готують тонкий, рівномірний мазок округлої чи овальної форми діаметром 1–1,5 см.

1.2. *Виготовлення препаратів-мазків із рідкого клінічного матеріалу або з культури на рідкому середовищі.* Бактеріологічною петлею набирають краплю досліджуваного матеріалу або культури із рідкого середовища з дотриманням правил асептики, як описано вище. Взятий матеріал наносять на предметне скельце і роблять рівномірний тонкий мазок. Якщо для забору матеріалу використовують стерильну пастерівську піпетку, на поверхню предметного скла з піпетки наносять краплю матеріалу і занурюють її в дезрозчин. Стерилізованою бактеріологічною петлею роблять мазок.

1.3. *Виготовлення мазків зі слизу або гною.* У разі готування мазків із матеріалів, які погано розтираються (гній, слиз), використовують два предметних скла. Невелику кількість матеріалу стерильною бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою наносять на середину знежиреного предметного скла і покривають його другим склом так, щоб 1/3 верхнього і нижнього скла залишалась вільною. Обидва скла сильно затискають між пальцями, роздавлюють досліджуваний матеріал і за вільні кінці розводять їх у сторони. Таким методом одержують два однакових мазки.

1.4. *Виготовлення мазків із фекалій.* На знежирене предметне скельце біля одного з країв наносять краплю фекалій з домішками слизу або крові, або краплю змиву зі слизової оболонки кишківника. Краєм іншого скельця, яке спеціально відшліфовано, торкаються нанесеного матеріалу, тримаючи його під кутом 45°. Швидко і обережно проводять ним у напрямку до дальнього краю, розтираючи його по склу. Правильно виготовлений препарат виходить тонким, дещо просвічується.

1.5. *Виготовлення мазків-відбитків.* Розжареним на полум'ї скальпелем припікають орган, з якого будуть робити мазок. Потім стерильними ножицями, тримаючи орган пінцетом, з цієї ділянки вирізають кусочок тканини. Поверхнею зрізу торкаються предметного скла у 2–4 місцях, роблячи мазок-відбиток.

Із нативного матеріалу, підготовленого для досліджень, готують по два мазки-відбитки з кожного органу і лімфатичного вузла. Після висушування препарати фіксують полум'ям і фарбують за методом Ціля-Нільсена:

- карболовий розчин фуксину Ціля (див. додаток Д) наносять на мазок через смужку фільтрувального паперу і нагрівають впродовж 5 хв (до пароутворення);
- після остигання залишок фарби зливають, мазок промивають водою;
- препарат обробляють 3 % розчином солянокислого спирту (до 97 см³ 70 % етилового спирту додають 3 см³ концентрованої соляної кислоти) до появи ледь помітного рожевого відтінку;
- промивають ретельно водою і дофарбовують метиленовим синім впродовж 3–5 хв;
- фарбу змивають водою, мазок висушують і досліджують під мікроскопом з використанням імерсійної системи.

Інтерпретація результату. Бактерії фарбуються у темно-червоний колір, розміщуються по одній або невеличкими скупченнями. Зернисті (нерівномірно забарвлені). Збудник не утворює спор і капсул, нерухливий, за Грамом фарбується позитивно. Серед кислотостійких бактерій паратуберкульозні мікобактерії найдрібніші, що враховують за мікроскопії препаратів. Звертають також увагу на помітний поліморфізм збудника: поряд з типовими короткими паличками знаходяться палички з розширеним кінцем, розгалужені та кокоподібні форми (Рис.1). Виявлення в мазках дрібних кислотостійких паличок темно-червоного кольору, розміщених характерними скупченнями на синьому фоні, є підставою для попереднього позитивного висновку [29].

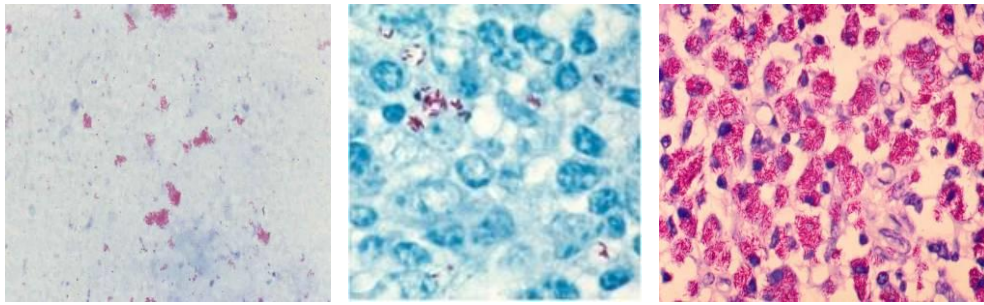


Рис. 1. Забарвлення *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* за Ціль-Нільсеном

II. Виділення чистої культури мікобактерій

Для виділення збудника використовують спеціальні збагачені живильні середовища. Біологічний або патологічний матеріал подрібнюють, піддають спеціальній обробці (згідно до п. 2.1.1.), гомогенізують до утворення суспензії і висівають у 5–6 пробірок з одним із селективних поживних середовищ (Дюбо-Сміта, Herrold із яєчного жовтка з мікобактином, Модифіковане середовище Дюбо, Левенштейна-Йенсена, Петраньяні). Основа середовища – гідролізат казеїну, інактивована нормальна сироватка крові великої рогатої худоби, аспарагін й суміш мінеральних солей. Середовище ущільнюють агаром і додають ростовий стимулюючий фактор – екстракт із сапрофітних мікобактерій. Для контролю висівають на середовище Левенштейна-Йенсена. Склад та методика приготування середовищ представлені у додатку Б. Засіяні пробірки витримують у термостаті за $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ продовж 3–4 міс. При високій концентрації збудника у матеріалі ознаки росту з'являються через 18–20 днів, слабкій – протягом 3–4 міс. Колонії сірувато-білі, плоскі з нерівними краями, які пізніше набувають горбкуватого вигляду (Рис.2). На середовищах без стимулятора росту паратуберкульозні мікобактерії не ростуть [29].



Рис.2. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* на середовищі Левенштейна-Йенсена

На поверхні рідких середовищ (Дюбо, Міддлбрука 7Н9 тощо) за культивування за температури $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ з'являється надзвичайно тонка плівка, яка поступово потовщується та через 3–4 місяці опускається на дно пробірки, утворюючи осад у вигляді великого сірувато-білого розпушеного скупчення (Рис.2).

Бульйон Міддлбрука 7Н9 підтримує ріст багатьох видів мікобактерій за доповнення поживними речовинами, такими як гліцерин, олеїнова кислота, альбумін і декстроза, за винятком *Mycobacterium bovis*, який інгібується гліцерином. Культури слід перевіряти впродовж 5–7 днів після інокуляції, а потім раз на тиждень впродовж 8 тижнів (Рис. 3) [29].



Рис. 3. Ріст мікобактерій на бульйонах Дюбо та Міддлбрука

Виділення культури *M. avium* (підвид *paratuberculosis*) із об'єктів навколишнього середовища (грунт, підстилка, зіскрібки з годівниць та стін,

вода, корми), фекалій, патологічного або біологічного матеріалу, молока, підготовленим відповідно до п. 2.1.1., проводять шляхом посіву в 5–6 пробірок з одним із селективних поживних середовищ (Дюбо-Сміта, Herrold із яєчного жовтка з мікобактином, модифіковане середовище Дюбо, Левенштейна-Йенсена, Петраньяні) в об'ємі 0,5 см³ відібраного матеріалу на верхню частину косяка. Нещільно закривають пробірку і розміщують її вертикально, щоб посівний матеріал рівномірно розподілився по всій довжині косяка. Засіяні пробірки інкубують у вертикальному положенні за температури 37±1⁰С продовж 2 год, після чого поміщають косяк у горизонтальне положення та інкубують 72 год за температури 37±1⁰С. Після цього, пробірки повертають у вертикальне положення та культивують продовж 3–4 міс. (Схема 1 у Додатку Д).

Для ідентифікації виділену культуру висівають на середовище із мікобактином і без нього. Збудник паратуберкульозу в перших генераціях розмножується на живильному середовищі лише в присутності мікобактину (Додаток В) [29].

III. Постановка біопроби

Біопробу широко не використовують у практиці, оскільки лабораторні тварини не чутливі до збудника паратуберкульозу, тому метод у конкретному випадку не є достатньо чутливим та, відповідно, ефективним. У літературі біопробу описують як диференційний метод від збудника туберкульозу, проте з цією метою можна використовувати посів на селективні середовища (Додаток Г) [38].

2.2. Молекулярно-генетичні методи досліджень

Відповідно до рекомендацій ВООЗт застосування ПЛР за діагностики паратуберкульозу може бути ефективним для наступних цілей:

1. Дослідження популяцій тварин, які є благополучними щодо захворювання.

2. Дослідження поодиноких тварин перед переміщенням у інші господарства.

3. Підтвердження клінічних випадків захворювання (з певними обмеженнями) [29].

Наразі розроблено ряд ДНК-зондів, які дозволяють виявляти MAP у діагностичних зразках і швидко ідентифікувати бактеріальні ізоляти. Вони використовуються для диференціації MAP від інших мікобактерій [30].

McFadden зі співавторами ще у 1987 році ідентифікували послідовність, названу IS900, яка є специфічною для MAP. З часом були секвеновані нові послідовності ДНК, які вважаються унікальними для цього патогену (ISMav2, f57 та ISMap02), що дозволяє ідентифікувати його методом ПЛР [3].

Наразі комерційно доступні ПЛР набори у реальному часі для виявлення MAP у різних зразках (кров, молоко, фекалії, тканини та зразки із навколишнього середовища). Цей метод є швидким, однак на його ефективність сильно впливає якість проведення пробопідготовки. Таким чином, метод екстракції, який забезпечує високоякісний зразок ДНК, є критичним для використання ПЛР у реальному часі [29].

Всі етапи пробопідготовки та проведення реакції зазначені у настановах та листівках-вкладках до конкретних наборів.

2.3. Серологічні методи досліджень

Відповідно до рекомендацій ВООЗт, серологічними тестами, які використовуються для діагностики паратуберкульозу, є твердофазний імуоферментний аналіз (ІФА, ELISA) для ВРХ і ДРХ та реакція імунодифузії в агаровому гелі (РІД, AGID) – для ДРХ [29]. Проте, в Україні на національному рівні частіше застосовується реакція зв'язування комплементу (РЗК, СФТ).

2.3.1. Методика постановки реакції зв'язування комплементу (РЗК)

РЗК може бути використана для діагностики багатьох інфекційних захворювань з метою виявлення специфічних антитіл.

Застосування цієї реакції не виключає постановки інших методів діагностики, однак її цінність полягає у підтвердженні діагнозу у клінічно хворих тварин. До переваг цієї реакції можна віднести і те, що за її постановки не використовуються канцерогени та інші агресивні хімічні реактиви (формальдегід, солянокислий цистеїн, меркаптоетанол тощо), що робить її застосування значно безпечнішим для обслуговуючого персоналу. У той же час, її постановка та інтерпретація результатів є відносно простими.

Зважаючи на все вищезазначене, саме РЗК здебільшого застосовується для серологічної діагностики паратуберкульозу у ветеринарних установах України.

Принцип реакції. РЗК належить до непрямих двосистемних імунологічних реакцій, яка використовується з метою діагностики (визначення в крові специфічних комплементзв'язуючих антитіл) із застосуванням відомого антигену до специфічних антитіл. На відміну від інших імунологічних реакцій, в РЗК відбувається взаємодія антитіла і антигена, за участі комплементу, який зв'язує антитіла (IgM, IgG) з антигеном.

В основі реакції лежать два процеси – бактеріоліз та гемоліз. Реакція ґрунтується на імунологічних принципах і відбувається за двома фазами:

1. Взаємодія антигену та антитіла за участю комплементу.
2. Виявлення ступеня зв'язування комплементу, що досягається додаванням гемолітичної системи.

Під час взаємодії імунної сироватки зі специфічним антигеном у присутності комплементу утворюється комплекс «антиген-антитіло». Якщо у дослідній сироватці специфічні антитіла відсутні, то комплекс «антиген-антитіло» не утворюється і комплемент залишається вільним.

Процес зв'язування комплементом антитіла з антигеном невидимий. Для того, щоб визначити, чи утворився цей комплекс, у реакцію, як індикатор, вводять гемолітичну систему. Якщо комплемент залишився вільним, то після додавання гемолітичної системи він переходить в останню і гемолізін спричинює гемоліз еритроцитів барана. Відсутність гемолізу буде свідчити про

відсутність вільного комплементу, адже він у бактеріолітичній системі зв'язав антитіла з антигеном.

Компоненти реакції.

- **Антиген** – це водна суспензія інактивованих мікроорганізмів *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (штами *M. paratuberculosis* 316F або рідше *Mycobacterium avium* D9) без ліпідної фракції. Застосовується у робочому титрі, вказаному на етикетці флакону.
- **Комплемент** – сироватковий молекулярний комплекс (сироватковий протеїн), який може зв'язуватися з комплексом «антиген-антитіло». Застосовується у титрі, встановленому у день постановки реакції шляхом титрування в бактеріолітичній системі.
- **Гемолізін** – сироватка від гіперімунізованих корлів проти гетерологічних червоних кров'яних тілець (еритроцитів) барана з високим титром антитіл. Вона спричинює *in vitro* лізис еритроцитів за наявності комплементу. Застосовується з робочим титром не нижче 1:500.
- **Позитивна сироватка** – сироватка крові із вмістом антитіл до збудника паратуберкульозу. Її застосовують під час титрування комплементу в бактеріолітичній системі та для контролю реакції в основному досліді після попередньої інактивації в день постановки реакції у розведенні 1:5 та 1:10 впродовж 30 хв за температури 62 °С.
- **Негативна сироватка** – сироватка крові від здорових тварин. Її застосовують під час титрування комплементу в бактеріолітичній системі та для контролю реакції в основному досліді після попередньої інактивації (розведення та інактивація ідентичні до позитивної сироватки).
- **2,5 % суспензія еритроцитів барана у фізіологічному розчині** – суспензія, яку застосовують сенсibilізованою. Для сенсibilізації гемолітичну систему (суміш рівних об'ємів 2,5 % суспензії еритроцитів та робочого розведення гемолізину) інкубують у водяній бані за температури 37–38 °С впродовж 20 хв.

- **Фізіологічний розчин (0,85 %)** – хімічно чистий хлорид натрію у дистильованій воді з рН 7,0–7,2.

Обладнання.

- Центрифуга з частотою обертання 3000 об./хв;
- автоклав;
- водяна баня із автоматичним регулюванням температури на 30 – 70 °С;
- одноканальні дозатори з перемінним об'ємом на 1–20 мкл, 50–200 мкл, 200–1000 мкл та накінечники до них;
- вортекс.

Перевірка на антикомплементаРНість та гематоксичність. Робочі розведення всіх компонентів для РЗК готують перед постановкою реакції і перевіряють їх на антикомплементаРНість та гематоксичність за схемою, наведеною у таблиці 2.

Таблиця 2

Схема контролю на антикомплементаРНість і гематоксичність компонентів РЗК

Компонент	АнтикомплементаРНість	Гематоксичність			
		КомплементаРНість	Гемоліз	Антиген	Фізіологічний розчин
КомплементаРНість	0,2	0,2	-	-	-
Гемоліз у робочому титрі	0,2	-	0,2	-	-
Антиген у робочому титрі	0,4	-	-	0,4	-
2,5 % суспензія еритроцитів	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Фізіологічний р-н	-	-	0,6	0,6	0,4
Результат	Гемоліз	Повна затримка гемолізу			

Для дослідження використовують компоненти, які не володіють антикомплементарними та гематоксичними властивостями.

Титрування компонентів. Під час постановки реакції необхідне точне дозування компонентів, що досягається їх титруванням, а саме: гемолізіну та комплекменту в гемолітичній та бактеріологічній системах.

1. Титрування гемолізіну. Для титрування беруть штатив з двома рядами пробірок. У першому ряду готують послідовні розведення гемолітичної сироватки, для чого із основного розведення гемолізіну 1:100 (0,1 см³ гемолізіну + 9,9 см³ фізіологічного розчину) готують розведення 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:2500, 1:3000, 1:3500 і т.д. (табл. 3).

Таблиця 3

Схема приготувань розведення гемолізіну

Компонент	Номери пробірок та об'єм реактивів, см ³						
	1	2	3	4	5	6	7
Гемолізін (см ³) розведення (1:100)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Фізіологічний розчин	0,4	0,9	1,4	1,9	2,4	2,9	3,4
Одержане розведення	1:500	1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500

По 0,2 см³ кожного розведення гемолізіну переносять у відповідну пробірку другого ряду, на яких позначають ступінь розведення. До пробірок другого ряду також додають комплекмент (застосовують в реакції в розведенні 1:20) по 0,2 см³ та суспензію еритроцитів барана – по 0,2 см³. Замість сироваток та антигену до пробірок вносять по 0,4 см³ фізіологічного розчину. Схема внесення компонентів представлена у таблиці 4.

Схема титрування гемолізину

Компонент	Номери пробірок та об'єм реактивів, см ³						
	1	2	3	4	5	6	7
Одержане розведення	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
2,5 % суспензія еритроцитів	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Фізіологічний розчин	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Додатково ставлять наступні контролю:

- гемолізін 1:100 із суспензією еритроцитів та фізіологічним розчином без додавання комплекменту;
- комплемент із суспензією еритроцитів та фізіологічним розчином без додавання гемолізину;
- суспензія еритроцитів та фізіологічний розчин без додавання комплекменту та гемолізину.

Пробірки з реактивами шутлюють і поміщають у водяну баню за 37–38 °С на 10 хв і відразу проводять облік.

У всіх контролях не повинно бути гемолізу еритроцитів. Титром гемолізину вважається найменша його кількість, що необхідна для повного гемолізу 0,2 см³ суспензії еритроцитів за наявності комплекменту в кількості 0,2 см³ у розведенні 1:20.

Для титрування комплекменту та постановки основного дослідження гемолізін застосовують у робочому титрі, який є чотирикратною дозою порівняно з визначеним титром. Наприклад, якщо він складає 1:1000, то в реакції застосовується розведення 1:250.

2. Титрування комплекменту в гемолітичній системі. Проводять з метою визначення дози комплекменту, з якої слід починати його вносити у бактеріологічну систему. Для цього комплемент розводять 1:20 з фізіологічним розчином і вносять у пробірки в дозах 0,02 см³, 0,04 см³, 0,06 см³ і закінчуючи – 0,2 см³. Потім у кожен пробірку додають необхідну кількість фізіологічного

розчину до загального об'єму 0,2 см³, а подальше внесення компонентів проводять за схемою, що представлена у таблиці 5.

Таблиця 5

Схема титрування комплементу у гемолітичній системі

Компонент	Номери пробірок та об'єм реактивів, см ³									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Комплемент 1:20	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18	0,2
Фізіологічний розчин	0,18	0,16	0,14	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	-
Гемолітична система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Фізіол. розчин (замість бак. системи)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Водяна баня за 37–38 °С впродовж 10 хв

Можливий результат	ЗГ	ЗГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ
--------------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Примітка: ЗГ – затримка гемолізу; ЧГ – частковий гемоліз; ПГ – повний гемоліз.

Титром комплементу у гемолітичній системі вважають найменшу його кількість, яка викликала повний гемоліз 0,2 см³ суспензії еритроцитів за 37–38 °С впродовж 10 хв.

Якщо титр комплементу в гемолітичній системі визначається у дозі 0,18 см³ і вище (основне розведення 1:20), то титрування повторюють, користуючись основним розведенням комплементу 1:10.

3. Титрування комплементу в бактеріологічній системі. Титрування проводять із позитивною і негативною сироватками крові до паратуберкульозу. Кожну сироватку розводять 1:10 фізіологічним розчином та інактивують як описано вище.

Для титрування комплементу беруть два штативи (по одному для позитивної і негативної сироваток), у кожному з них по 2 ряди пробірок. Комплемент розводять 1:20 і вносять його у пробірки обох штативів, починаючи з дози на два інтервали

меншої, ніж титр комплементу у гемолітичній системі. Схема внесення компонентів реакції показана у таблиці 6.

Таблиця 6

Схема титрування комплементу у бактеріологічній системі

Компоненти реакції	Ряд пробірок у штативі	Номера пробірок та об'єм реактивів, см ³										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Позитивна, негативна сироватка	перший	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	другий	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Антиген у робочому титрі	перший	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	другий	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Фізіологічний розчин	перший	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	другий	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент у розведенні 1:20	перший	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
	другий	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18	0,18	0,20
Фізіологічний розчин	перший	0,18	0,16	0,14	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,02	–
	другий	0,18	0,16	0,14	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,02	–
Водяна баня 37–38 °С – 20 хв												
Гемолітична система	перший	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	другий	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяна баня 37–38 °С – 20 хв												
Можливий результат	перший	ЗГ	ЗГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ
	другий	ЗГ	ЗГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Примітка: ЗГ – затримка гемолізу; ЧГ – частковий гемоліз; ПГ – повний гемоліз.

Після внесення гемолітичної системи та повторної інкубації проводять облік реакції.

Титром комплементу у бактеріолітичній системі вважається пробірка з найменшою його кількістю, необхідною для повного гемолізу 0,2 см³ суспензії еритроцитів у присутності негативної сироватки з антигеном і без антигену та

паратуберкульозної сироватки без антигену, а також у разі затримки гемолізу у пробірках з паратуберкульозною сироваткою з антигеном. Визначений титр приймається за робочий для основного дослідю.

Постановка основного дослідю. Реакцію ставлять в загальному об'ємі 1,0 см³ всіх компонентів. Кожну дослідну сироватку досліджують у розведенні 1:5 (з антигеном) та 1:10 (з антигеном та без антигену) після попередньої інактивації за температури 62 °С впродовж 30 хв на водяній бані. Комплемент застосовують у встановленому титрі. Час зв'язування комплекменту в бактеріологічній системі та час гемолізу по 20 хв на водяній бані за 37–38 °С.

У таблиці 7 наведено схему проведення основного дослідю.

Таблиця 7

Схема внесення компонентів у основному дослідю

Компоненти реакції	Об'єм реактивів, см ³	
	Пробірка з дослідною сироваткою (антигенний ряд)	Пробірка з дослідною сироваткою (безантигенний ряд)
Дослідні сироватки крові	0,02	0,02
Фізіологічний розчин	0,18	0,18
Водяна баня 62 °С – 30 хв з метою інактивації сироватки		
Антиген у робочому титрі	0,2	–
Фізіологічний розчин	–	0,2
Комплемент у робочому титрі	0,2	0,2
Водяна баня 37–38 °С – 20 хв		
Гемолітична система	0,4	0,4
Водяна баня 37–38 °С – 20 хв		

Під час постановки основного дослідю ставлять контролі:

- негативна та позитивна сироватки у розведеннях 1:5 (з антигеном) та 1:10 (з антигеном та без антигену).

Облік та інтерпретація результатів. Облік проводиться візуально 2 рази: перший раз – відразу після закінчення інкубації штативів у водяній бані; другий раз – через 14–18 год витримування проб за кімнатної температури.

Результати реакції оцінюють у хрестах згідно зі схемою:

++++ (4 хрести) – відсутність гемолізу;

+++ (3 хрести) – гемоліз 25 % еритроцитів;

++ (2 хрести) – гемоліз 50 % еритроцитів;

+ (1 хрест) – гемоліз 75 % еритроцитів;

(мінус) – повний гемоліз еритроцитів, осад відсутній, рідина інтенсивно забарвлена гемоглобіном.

Реакцію вважають позитивною у разі затримки гемолізу еритроцитів на 2–4 хрести за умов відсутності антикомплементарних властивостей дослідної проби без антигену та коректного спрацьовування контролів [38].

2.3.2. Постановка методу імуноферментного аналізу (ІФА)

Наразі, ІФА є найбільш ефективним тестом для виявлення антитіл до МАР у ВРХ та ДРХ. Його чутливість є значно вищою у субклінічно інфікованих носіїв [29].

Принцип методу. На сьогодні розроблена та комерційно доступна низка імуноферментних тест-систем. Їх принцип базується на взаємодії антигена із антитілом у лунках спеціальних полістиролових планшетів з подальшим ферментативним виявленням утвореного специфічного імунного комплексу за допомогою ферментного субстрату.

Необхідні реактиви та обладнання для проведення аналізу.

- набір діагностичної імуноферментної тест-системи;
- деіонізована або дистильована вода;
- розчин етилового спирту (70 %);
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- одноканальні дозатори з перемінним об'ємом на 1–20 мкл, 50–200 мкл, 200–1000 мкл та накінечники до них;
- багатоканальні дозатори (8 – або 12 – каналні) з перемінним об'ємом на 50–300 мкл та накінечники до них;

- мірні циліндри та стакани;
- ванночки для реагентів;
- мікропробірки для попереднього розведення сироваток (за необхідності);
- термостат, з температурою $21 \pm 5^{\circ}\text{C}$;
- вошер для промивання мікропланшетів;
- 96-луночний електрофотометр (імуноферментний аналізатор) з довжиною хвилі 450 – 620 нм;
- вортекс;
- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;
- контейнер для зливання відпрацьованих забруднених рідин (деякі компоненти реакції є канцерогенами, тому їхні залишки необхідно обережно відбирати в контейнери для утилізації).

Підготовка до проведення дослідження. Перед початком роботи всі компоненти набору та зразки сироваток крові чи молока необхідно довести до кімнатної температури ($20\text{--}25^{\circ}\text{C}$). Після цього реагенти ретельно шутлюються до однорідності за допомогою вортекса або обертальними рухами перевертаючи вміст флаконів.

У таблицю, секції якої відповідають номерам лунок мікропланшетів, вноситься нумерація досліджуваних проб. У таблиці 8 наведено приклад такого внесення за досліджень 92 зразків та 4 контролів.

Таблиця 8

Приклад внесення нумерації досліджуваних зразків перед постановкою ІФА

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K-	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
B	K-	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
C	K+	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
D	K+	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
E	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
F	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
G	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
H	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92

Примітка: K- – негативний контроль; K+ – позитивний контроль; 1 – 92 – досліджувані зразки.

Всі реагенти, необхідні для проведення ІФА потрібно готувати у ході постановки, щоб мінімізувати їхній контакт зі світлом та повітрям приміщення, враховуючи необхідний об'єм для кількості досліджуваних зразків [36].

Правила, яких необхідно дотримуватися під час проведення досліджень методом ІФА.

1. Не використовувати для постановки реакції реагенти, у яких закінчився термін придатності, забруднені або реагенти з інших тест-наборів.

2. Під час проведення досліджень використовувати засоби індивідуального захисту (одноразові рукавички, халати тощо), оскільки деякі реагенти у своєму складі містять токсичні сполуки (хромоген) та кислоти (стоп-реактив).

3. Для роботи бажано використовувати одноразовий посуд для усунення сторонніх фонових реакцій, адже ферментативна реакція дуже чутлива до домішок, особливо, до металів. Відповідно, металеві предмети не повинні контактувати з розчинами реактивів.

4. Не допускати підсихання лунок мікропланшету на всіх етапах постановки ІФА.

5. Всі компоненти реакції необхідно вносити в центр лунки мікропланшету, щоб попередити потрапляння реагентів на його поверхню або навколо лунок.

6. Для внесення реагентів та сироваток необхідно використовувати одноразові накінечники.

7. Необхідно звести до мінімуму контакт розчину хромогену зі світлом та повітрям приміщення для уникнення його окиснення.

8. По завершенню роботи всі використані матеріали слід зібрати у спеціальний контейнер та знешкодити автоклавуванням впродовж 1 год за температури 121°C. Обладнання та робочі поверхні обробити 70% розчином етилового спирту [8, 29].

Проведення дослідження. Постановка тест-систем ІФА, облік та інтерпретація одержаних результатів проводиться згідно настанов та листівок-вкладок до наборів і включає наступні загальні етапи:

1. Внесення у лунки із сорбованим антигеном досліджуваних проб, а також негативного та позитивного контролів.

Примітка: за постановки деяких тест-систем досліджувані зразки та контролі розводяться спеціальними буферними розчинами, що входять до тест-наборів згідно листівок-вкладок (англ. *Dilution buffer*).

Якщо в сироватці крові містяться антитіла (АТ І) до антигену інфекційного агента, вони розпізнають відповідні антигени (АГ), зв'язуються з ними і утворений комплекс залишається в лунці після подальших відмивань. Перша стадія є “специфічною”, тому що саме під час неї відбувається специфічне розпізнавання антигену антитілами.

2. Відмивання лунок від антитіл та антигенів, що не утворили імунний комплекс із застосуванням спеціального буфера, що містить детергент (поверхнево-активну речовину) (англ. *Wash solution*).

Примітка: розчин для відмивання лунок мікропланшету готується із концентрату, що входить до набору тест-системи згідно листівки-вкладки до неї.

3. Внесення розчину кон'югату (вторинні антитіла, або антитіла 2-го порядку, кон'юговані з ферментом (АТ ІІ)) (англ. *Conjugate*).

Примітка: розчин кон'югату готується із концентрату, що входить до набору тест-системи згідно листівки-вкладки до неї (англ. *Concentrated conjugate*).

Вторинні антитіла специфічно розпізнають первинні (специфічні антитіла у сироватці крові), що утворили комплекс з сорбованим антигеном і у лунці мікропланшета виникає «молекулярний ланцюг».

4. Повторне відмивання лунок від елементів, які не утворили структуру «молекулярного ланцюга» із застосуванням спеціального буфера (англ. *Wash solution*).

5. Додавання проявника (субстрату-хромогену чи ферментного субстрату) (англ. *Chromogen solution* або *Substrate solution*).

Найчастіше у якості проявника застосовують тетраметилбензидин (ТМБ). Його використовують для виявлення мітки антитіл другого порядку. Хромоген за участю ферменту кон'югату перетворюється в речовину, оптичне поглинання якої визначають на планшетному спектрофотометрі (рідері).

6. Зупинення ферментативної реакції стоп-реактивом [36].

Облік та інтерпретація результатів. Детекція утвореного продукту шляхом вимірювання оптичної густини вмісту лунок мікропланшету на спектрофотометрі за довжини хвилі, що зазначена у листівці-вкладці до набору.

2.3.3. Методика постановки реакції імунодифузії в агаровому гелі (РІД)

РІД можна ефективно застосовувати для підтвердження діагнозу у ДРХ із клінічною підозрою. Крім того, відповідно до рекомендацій ВООЗт, ця реакція може бути використана для моніторингу за поширенням інфекції у популяціях тварин [29].

Компоненти реакції.

- **Агарово-сольова суміш** – готується шляхом плавлення 1,5 г агару в 100 см³ 0,15 М NaCl на водяній бані.
- **Позитивна сироватка** – гіперімунна сироватка крові кроля із вмістом антитіл до збудника MAP.
- **Негативна сироватка** – сироватка крові від здорових тварин.
- **Протоплазмений (соникат) антиген із MAP** – одержується шляхом руйнування клітин збудника та подальшим центрифугуванням.

Обладнання.

- Штамп (різак для агарового гелю);

- освітлювач;
- автоклав;
- термостат із автоматичним регулюванням температури;
- одноканальні дозатори з перемінним об'ємом на 1–20 мкл, 50–200 мкл, 200–1000 мкл та накінечники до них.

Проведення дослідження. У чашки Петрі вносять агарово-сольову суміш на висоту 3–4 мм та залишають їх до повного застигання. Штампом роблять в агарі одну центральну лунку та шість по периферії (шматочки агара, що утворюються при його пробиванні, видаляються голкою).

У центральну лунку вноситься антиген, а у бічні – досліджувані зразки та контролю (позитивна і негативна сироватки). Після внесення реагентів чашки інкубують у вологій камері за температури не менше 20 °С.

Облік та інтерпретація результатів. Облік реакції проводять візуально за денного освітлення або із використанням освітлювача через 24 та 48 год інкубації. Поява однієї або кількох чітко видимих ліній преципітації між центральною лункою з антигеном та бічними лунками із досліджуваними сироватками через 24 або 48 год вказує на позитивну реакцію, за умови, що така лінія утворилася між центральною лункою та позитивним контролем і відсутня між антигеном і негативним контролем. Відповідно, відсутність ліній преципітації інтерпретується як негативний результат.

За відсутності у контролі з позитивною сироваткою лінії преципітації, Результати РІД із дослідними сироватками не підлягають обліку і реакцію необхідно переставити [29, 38].

2.4. Шкірний тест на паратуберкульоз

Виявлення системної відповіді, опосередкованої імунокомпетентними клітинами, могло б відігравати важливу роль у діагностиці паратуберкульозу, оскільки клітинний імунітет передує гуморальному. Проте, шкірний тест на гіперчутливість повільного типу (ГПТ) має обмежену цінність.

Процедура проведення шкірного тесту. Проводиться шляхом внутрішньошкірного введення 0,1 см³ антигену в підстрижене або поголене місце, як правило, з боку середньої третини шиї. Для цієї мети використовували пташиний туберкулін PPD або очищені білки *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, оскільки вважалось, що обидва препарати мають подібну чутливість і специфічність.

Досліди на тваринах проводяться згідно з Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» [13, 35].

Інтерпретація результатів. Товщину шкіри вимірюють штангенциркулем до інокуляції і через 72 год після неї. Збільшення товщини шкіри понад 2 мм слід розглядати як ознаку наявності ГПТ. Однак, відповідно до даних ВООЗт, сенсibilізація до комплексу MAP широко поширена у тварин, проте ні пташиний туберкулін, ні *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* не є високоспецифічними. На продуктивність цього тесту також можуть суттєво вплинути незначні антигенні відмінності, які виникають у різних партіях антигену. Враховуючи все вищезазначене, для підвищення ефективності шкірного тесту необхідні подальші дослідження [29].

2.5. Гама-інтерферон тест

Метод базується на вивільненні гама-інтерферону (IFN- γ) із сенсibilізованих лімфоцитів впродовж 18–36-год інкубаційного періоду зі специфічним антигеном (пташиний або бичачий туберкулін PPD). Кількісне визначення бичачого IFN- γ здійснюється за допомогою сендвіч-систем ІФА, у яких застосовуються два моноклональних антитіла до бичачого IFN- γ .

Проте, оскільки комерційні набори ІФА були розроблені для визначення бичачого IFN- γ за діагностики туберкульозу ВРХ, одержані результати важко інтерпретувати щодо паратуберкульозу. Так, у ВРХ специфічність такого тесту

коливається від 67% до 94%, а чутливість – від 13% до 85%, залежно від критеріїв інтерпретації [29].

Методика постановки і необхідні тестові матеріали описані в інструкціях та листівках-вкладках до наборів. Тест-системи ІФА комерційно доступні для кількісного виявлення IFN- γ у плазмі великої рогатої худоби, овець і кіз.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Aiello S. E. Paratuberculosis. In: The Merck veterinary manual, 11th Edition / S. E. Aiello, M. A. Moses. – Merck and Co, 2016. – P. 762–764.
2. Arrazuria R. Mycobacterial infections in rabbits: from the wild to the laboratory / R. Arrazuria, R. A. Juste, N. Elguezabal // Transboundary and Emerging Diseases. – 2017. – Vol. 64(4). – P. 1045–1048.
3. Arteche-Villasol N. Early response of monocyte-derived macrophages from vaccinated and non-vaccinated goats against in vitro infection with *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis / N. Arteche-Villasol [et al.] // Veterinary research. – 2021. – Vol. 52(1). – 69 p.
4. Beard P. M. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland / P. M. Beard [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 2001. – Vol. 39(4). – P. 1517–1521.
5. Beinhauerova M. Development of a reference standard for the detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis by quantitative PCR / M. Beinhauerova [et al.] // Scientific reports. – 2021. – Vol. 11(1). – P. 116–122.
6. Carvalho I. A. Diagnosis of paratuberculosis in cattle: microbiological culture, serology and PCR / I. A. Carvalho // Brazilian journal of microbiology. – 2012. – Vol. 43(2). – P. 581–585.
7. de Silva K. Developing smarter vaccines for paratuberculosis: From early biomarkers to vaccine design / K. de Silva // Immunological reviews. – 2021. – Vol. 301(1). – P. 145–156.
8. Dimareli-Malli Z. Culture phenotypes and molecular characterization of *Myobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from small ruminants / Z. Dimareli-Malli [et al.] // Research in Veterinary Science. – 2013. – Vol. 95(1). – P. 49–53.
9. Dohmann K. Characterization of genetic differences between *Myobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates / K. Dohmann [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 41. – P. 5215–5223.

10. Dow C. T. Mycobacterium paratuberculosis zoonosis is a One Health emergency / C. T. Dow, B. L. Alvarez // EcoHealth. – 2022. – Vol. 19(2). – P. 164–174.
11. Elmagzoub W. A. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and microbiome profile of patients in a referral gastrointestinal diseases centre in the Sudan / W. A. Elmagzoub [et al.] // PloS one. – 2022. – Vol. 17(4). – e0266533.
12. Estevinho M. M. Viable *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* Colonizes Peripheral Blood of Inflammatory Bowel Disease Patients / M. M. Estevinho [et al.] // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11(6). – P. 1520.
13. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.
14. Fanelli A. Assessment of Paratuberculosis international official reporting in Europe using the information supplied to the WOAHP by National Veterinary Services / A. Fanelli [et al.] // Veterinaria italiana. – 2022. – Vol. 58(2). – 10.12834/VetIt.2625.16709.3.
15. Fanelli A. Paratuberculosis at European scale: an overview from 2010 to 2017 / A. Fanelli [et al.] // Veterinaria italiana. – 2020. – Vol. 56(1). – 10.12834/VetIt.1829.9692.3.
16. Fecteau M. E. Paratuberculosis in Cattle / M. E. Fecteau // The Veterinary clinics of North America. Food animal practice. – 2018. – Vol. 34(1). – P. 209–222.
17. Fernández M. Experimental infection of lambs with C and S-type strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: immunological and pathological findings / M. Fernández [et al.] // Veterinary Research. – 2014. – Vol. 45. – 5 p.
18. Garcia A. B. The economic impact and control of paratuberculosis in cattle / A. B. Garcia, L. Shalloo // Journal of Dairy Science. – 2015. – Vol. 98(8). – P. 5019–5039.
19. Gilardoni L. R. Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests / L. R. Gilardoni, F. A. Paolicchi,

S. L. Mundo // Revista Argentina de Microbiologia. – 2012. – Vol. 44(3). – P. 201–215.

20. Jain M. Development of rELISA using novel markers for the diagnosis of paratuberculosis / M. Jain [et al.] // Journal of immunological methods. – 2021. – Vol. 497. – P. 105–113.

21. Jurado-Martos F. Evaluation of the diagnostic accuracy of the serological test for paratuberculosis in cattle according to tuberculosis status / F. Jurado-Martos [et al.] // The Veterinary record. – 2023. – Vol. 193(9). – e3313.

22. Juste R. A. Control of paratuberculosis in sheep and goats / R. A. Juste, V. Perez // Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. – 2011. – Vol. 27(1). – P. 127–138.

23. Li L. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on dairy farms / L. Li [et al.] // Annual Review of Animal Biosciences. – 2016. – Vol. 4. – P. 155–176.

24. McAloon C. G. The effect of paratuberculosis on milk yield--A systematic review and meta-analysis / C. G. McAloon [et al.] // The Journal of Dairy Science. – 2016. – Vol. 99(2). – P.1449–1460.

25. McNees A. L. Mycobacterium paratuberculosis as a cause of Crohn's disease / A. L. McNees [et al.] // Expert review of gastroenterology and hepatology. – 2015. – Vol. 9(12). – P. 1523–1534.

26. Ozana V. Neglected Facts on *Mycobacterium Avium* Subspecies *Paratuberculosis* and Type 1 Diabetes / V. Ozana, K. Hruska, L. A. Sechi // International journal of molecular sciences. – 2022. – Vol. 23(7). – P. 36–57.

27. Rosenfeld G. Mycobacterium avium paratuberculosis and the etiology of Crohn's disease: a review of the controversy from the clinician's perspective / G. Rosenfeld, B. Bressler // Canadian journal of gastroenterology – 2010. – Vol. 24(10). – P. 619–624.

28. Stevenson K. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review / K. Stevenson // Veterinary Research. – 2015. – Vol. 46. – 64 p.

29. Terrestrial Animal Health Code, Ch. 3.1.16. *Paratuberculosis (Johne's disease)* (NB: Version adopted in 2021). – 16 p.

30. Vary P. H. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease / P. H. Vary // *Journal of clinical microbiology*. – 1990. – Vol. 28(5). – P. 933–937.

31. Waddell L. A. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analyses of the evidence / L. A. Waddell [et al.] // *Epidemiology and Infection*. – 2015. – Vol. 143(15). – P. 3135–3157.

32. Waddell L. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detection in animals, food, water and other sources or vehicles of human exposure: A scoping review of the existing evidence / L. Waddell [et al.] // *Preventive veterinary medicine*. – 2016. – Vol. 132. – P. 32–48.

33. Windsor P. A. Paratuberculosis in sheep and goats / P. A. Windsor // *Veterinary Microbiology*. – 2015. – Vol. 181(1-2). – P. 161–169.

34. Завгородній А. І. Дослідження епізоотичних сироваток крові жуйних тварин у реакції зв'язування комплементу (РЗК) з паратуберкульозним антигеном / А. І. Завгородній [та ін.] // *Ветеринарна медицина*. – 2019. – Вип. 105. – С. 41–45.

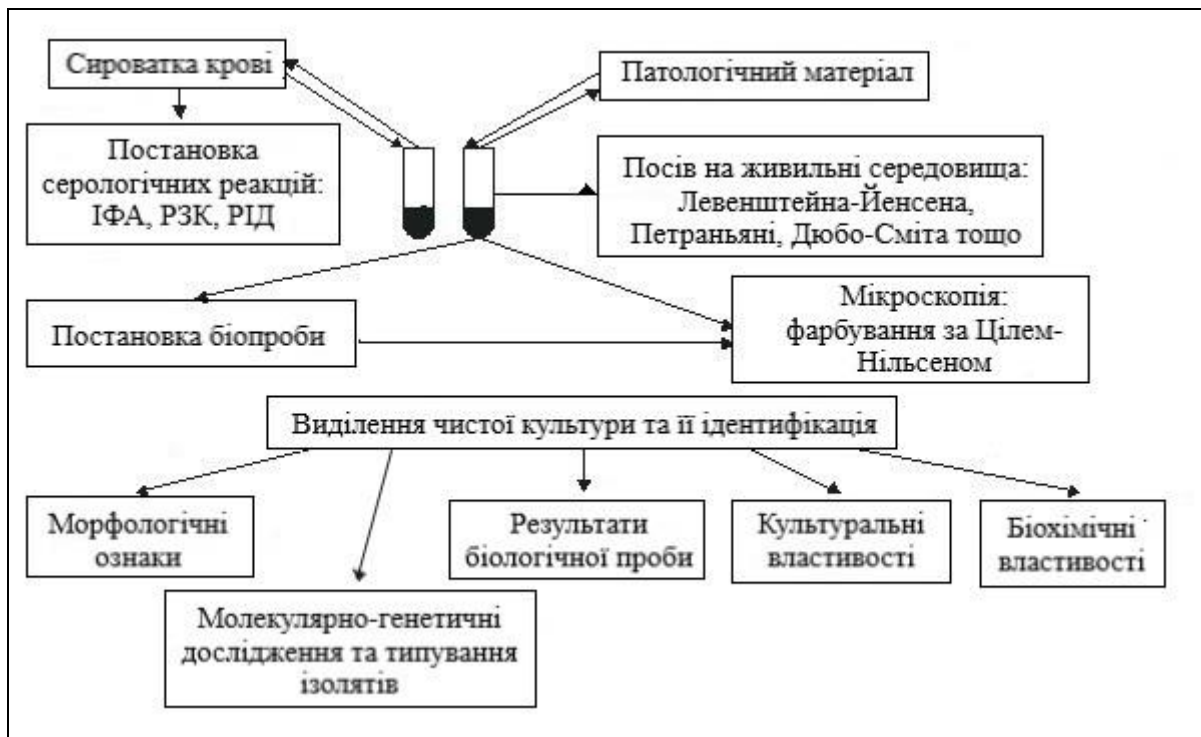
35. Закон України № 3447–IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» / Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 2006. – № 27. – С. 990, ст. 230. (Бібліотека офіційних видань).

36. Іванська Н. В. Практичний посібник з імуноферментного аналізу / Н. В. Іванська, О. М. Кислих, О. В. Максименок [та ін.] – К.: Діапроф-Мед, 2005. – 63 с.

37. Корнієнко Л. Є. Хронічні інфекційні хвороби тварин / Л. Є. Корнієнко, В. О. Бусол, В. В. Недосєков [та ін.]. – Біла Церква, 2009. – 291 с.

38. Лабораторна діагностика паратуберкульозу. Методичні рекомендації. Харків, 2014. – 22 с.

Загальна схема проведення лабораторних досліджень на паратуберкульоз



Селективні середовища

А. Середовище Herrold із яєчного жовтка з мікобактином

Склад на 1 літр середовища: 9 г пептону; 4,5 г хлориду натрію; 2,7 г екстракту яловичини; 27 см³ гліцерину; 4,1 г пірувату натрію; 15,3 г агару; 2 мг мікобактину; 870 см³ дистильованої води; 6 шт. яєчних жовтків (120 см³) та 5,1 см³ 2 % водного розчину малахіту зеленого.

Методика приготування. Зважити перші шість інгредієнтів та розчинити у дистильованій воді при підігріванні. Довести рН рідкого середовища до 6,9–7,0 за допомогою 4% NaOH і протестувати, щоб переконатися, що рН твердої фази становить 7,2–7,3. Додати мікобактин, розведений у 4 см³ етилового спирту. Автоклавувати за 121⁰С впродовж 25 хв. Охолодити до 56 °С та асептичним способом додати 6 стерильних яєчних жовтків (120 см³) і стерильний розчин малахіту зеленого. Обережно перемішати та розподілити по стерильним пробіркам.

Дозволяється додавати 50 мг хлорамфеніколу, 100 000 Е пеніциліну та 50 мг амфотерицину В.

Б. Модифіковане середовище Dubos

Склад на 1 літр середовища: 2,5 г казамінових кислот; 0,3 г аспарагіну; 2,5 г безводного динатрій водень фосфату; 1 г калій диводень фосфату; 1,5 г цитрату натрію; 0,6 г кристалічного сульфату магнію; 25 см³ гліцерину; 50 см³ 1% розчину Твін-80 та 15 г агару.

Методика приготування. Розчинити кожен сіль у дистильованій воді при мінімальному підігріві та довести розчин до 800 см³. Додати мікобактин у спиртовому розчині при 0,05% (2 мг мікобактину розчинити в 4 см³ етилового спирту), нагріти середовище до 100 °С проточною парою, а потім стерилізувати автоклавуванням за температури 115 °С продовж 15 хв. Охолодити до 56 °С у водяній бані, додати антибіотики (100 000 Е пеніциліну; 50 мг хлорамфеніколу та 50 мг амфотерицину В) та сироватку (200 см³ сироватки ВРХ простерилізованої фільтрацією через прокладку Seitz "EX" та інактивованою термічно за температури 56 °С впродовж 1 год. Середовище ретельно перемішати, розподілити по стерильним пробіркам.

Перевагою цього середовища є те, що воно прозоре, а це полегшує раннє виявлення колоній.

В. Базове середовище Левенштейна-Йенсена

Склад: суміш сольового розчину та емульсії вмісту курячих яєць. Для отримання сольового розчину до 600 см³ дистильованої води додають 12 см³ гліцерину; 3,6 г аспарагіну; 2,4 г однозаміщеного калію фосфату; 0,24 г магнію сульфату; 0,6 г магнію цитрату; 5 г картопляного крохмалю; 0,4 г малахітового зеленого. Суміш стерилізують автоклавуванням при 120°C продовж 15 хв.

Для приготування яєчної емульсії 20–25 ретельно вимитих і витриманих 1 год в 70% спирті курячих яєць, жовтки та білки виливають у стерильну колбу з бусами.

Методика приготування. У велику стерильну ємність, дотримуючись правил стерильності, поміщають такі розчини:

Сольовий розчин – 600 см³

Гомогенізована яєчна маса – 1000 см³

Ретельно перемішують і фільтрують через 4-шаровий стерильний марлевий фільтр. Додають 20 см³ розчину малахітового зеленого, ретельно перемішують, уникаючи утворення піни, і протягом не більше 15 хв розливають у пробірки приблизно по 5 см³, стежачи за тим, щоб у розчині не сформувався осад.

Згортання середовища. Для зсідання середовища використовуються спеціальні апарати-згортачі типу "АСІС". Пробірки з розлитим середовищем поміщають у спеціальні штативи з підібраним кутом нахилу для формування косяка середовища. Штативи встановлюють у згортач і проводять коагуляцію за 85°C продовж 45 хв. Приготування живильного середовища проводиться в умовах дотримання стерильності, оскільки згортання є не стерилізуючою, а лише коагулюючою процедурою.

Якість приготованого яєчного середовища залежить від дотримання температурного та часового режимів коагуляції. Знебарвлення середовища, наявність бульбашок або заглиблень на її поверхні свідчить про порушення режиму згортання. Повторне згортання також погіршує якість середовища. Середовища з порушеним режимом згортання підлягають видаленню.

Перевірка на стерильність. Після згортання кожна новоприготована партія середовища контролюється на стерильність. Для цього вона інкубується у термостаті впродовж 2–3 діб за температури 37°C.

Зберігання. Приготовлена партія середовища повинна мати дату виготовлення і зберігатися в холодильнику за 4°C із ретельно закритими пробками для запобігання висиханню. Термін зберігання середовища не повинен перевищувати 4 тижні.

Г. Середовище Петраньяні

Склад: незбиране молоко 300 см³; картопляний крохмаль 12 г; пептон – 2 г; додають почищені та дрібно нарізані 2 картоплини розміром з куряче яйце; 8 цілих курячих яєць та 2 жовтки; 24 см³ гліцерину; 20 см³ 2 % стерильного водного розчину малахітової зелені.

Методика приготування. Перелічені компоненти перемішують в колбі, суміш декілька хвилин кип'ячать на водяній бані. Потім колбу залишають на водяній бані ще на 1 год. Суміш охолоджують до 50 °С і додають 8 цілих курячих яєць та 2 жовтки, 24 см³ гліцерину, 20 см³ 2% стерильного водного розчину малахітової зелені, добре змішують, фільтрують через лійку із подвійним марлевим фільтром, розливають у пробірки та стерилізують.

Д. Середовище Дюбо-Сміта

Склад: До 1л дистильованої води додають гідролізат казеїну 0,50 г; L- аспарагін – 2 г; Твін-80 – 0,20 г; калію дигідрохлорид – 1 г; натрію гідрофосфат – 2,5 г; залізоамонійний цитрат 0,05 г; магнію сульфату – 0,01 г; кальцію хлориду – 0,0005 г; цинку сульфату – 0,0001 г; міді сульфату 0,0001 г. На кожні 180 см³ середовища додають по 10 см³ гліцерину.

Методика приготування. Середовище кип'ячать до повного розчинення компонентів та стерилізують автоклавуванням за 1 атм (121⁰С) продовж 15 хв. Охолоджують до 50 °С, дотримуючись правил асептики додають на кожні 180 см³ основи бульйону по 20 см³ інактивованої сироватки крові ВРХ.

Е. Середовище Міддлбрука 7Н9 з гліцериновим середовищем

Склад: монофосфат калію 2 г/л; динатрійфосфат 1,5 г/л; глютамат натрію 0,5 г/л; цитрат натрію 0,1 г/л; сульфат амонію 0,5 г/л; піридоксин 0,001 г/л; цитрат тривалентного заліза амонію 0,04 г/л; сульфат магнію 0,05 г/л; сульфат цинку 0,001 г/л; сульфат міді 0,001 г/л; біотин 0,5 мг/л; хлорид кальцію 0,5 мг/л.

Методика приготування. На кожні 450 см³ основи додають 1 см³ гліцерину. Середовище кип'ячать до повного розчинення компонентів та стерилізують автоклавуванням за 1 атм (121 °С) впродовж 15 хв.

**Ростові властивості *M. avium* (підвид *paratuberculosis*)
на селективних середовищах**

Назва середовища	Характеристика росту	Початок росту
Середовище Міддлбрука 7Н9 з гліцериновим середовищем (бульйон)	З'являється надзвичайно тонка плівка, яка поступово потовщується та через 3–4 місяці опускається на дно пробірки, утворюючи осад у вигляді великого сірувато-білого розпушеного скупчення.	2–3 міс.
Середовище Міддлбрука 7Н10 з гліцериновим середовищем	Колонії штаму ВРХ менш опуклі, особливо у старих культурах. Вони малі в розмірі приблизно до 1 мм в діаметрі будучи світло-коричневого кольору, трохи світліші за середовище. Колонії овечого штаму опуклі, м'які, вологі, блискучі, від брудно-білого до світло-коричневого кольору і дуже схожі із кольором середовища. Колонії дрібні від шпилькової головки до 0,5 мм, але можуть досягати 1 мм і рідко 1,5 мм, якщо на скошеному агарі виростає кілька колоній.	18–20 діб, частіше через 3 міс.
Середовище Herrold із яєчного жовтка з мікобактином	Дрібні колонії, напівсферичні, м'які, немукотні, спочатку безбарвні та прозорі. Розмір колонії 0,25–1 мм, з тенденцією до відсутності зростання, при цьому колонії будуть численні на скошеному агарі. Межі колонії круглі та рівні, а їх поверхні гладкі та блискучі. У міру продовження інкубації колонії стають більшими, більш опуклими, непрозорими, від брудно-білого до світло-коричневого або бежевого кольору. Старіші ізольовані колонії можуть досягати до 2 мм. Морфологія колоній з часом змінюється з гладкої на шорстку і з напівсферичної на ту, що має округлі виступи.	18–20 діб, частіше через 3 міс.
Середовище Дюбо-Сміта	Ріст перших генерацій на цьому середовищі спостерігаються на 50-ту добу у вигляді білуватих, дуже дрібних, непрозорих колоній. Надалі розвиток колоній відбувається повільно, продовж 3–4 міс., утворюючи холестеринове нашарування на поверхні середовища, а на дні пробірки з часом випадають сухі жовтуваті зерна.	50 діб
Середовища Левенштейна-Йенсена та Петраньяні	Колонії сірувато-білі, плоскі з нерівними краями, які пізніше набувають горбкуватого вигляду.	18–20 діб, частіше через 3–4 міс.

Біохімічних властивостей мікобактерій

Назва збудника	Нітроредуктазний тест	Каталазний тест		Піразіномідазний тест	Ріст на середовищі ТСН*	Ніациновий тест
		К-ний	pH 7,0			
<i>M. tuberculosis</i>	+	< 45	-	+	+	+
<i>M. bovis</i>	-	< 45	-	-	-	В
<i>M. avium</i> (<i>підвид paratuberculosis</i>)	-	< 45	-	+	+	-
<i>M. smegmatis</i>	+	>45	+	NA	+	-

Примітка: *тіофенкарбоксілазне середовище; В – реакція варіабельна; NA – дані відсутні; + позитивний результат; - негативний результат.

Біохімічна ідентифікація



Набір для каталазного тесту: піна із бульбашок кисню виникає у разі позитивній реакції.



Набір для нітроредуктазного тесту:
праворуч – позитивна реакція;
ліворуч – негативна реакція.



Набір для піразімідазного тесту:
ліворуч – вихідний колір;
по центру – негативний контроль;
праворуч – позитивний контроль.



Набір для тіофенкарбоксілазного тесту ТСН:

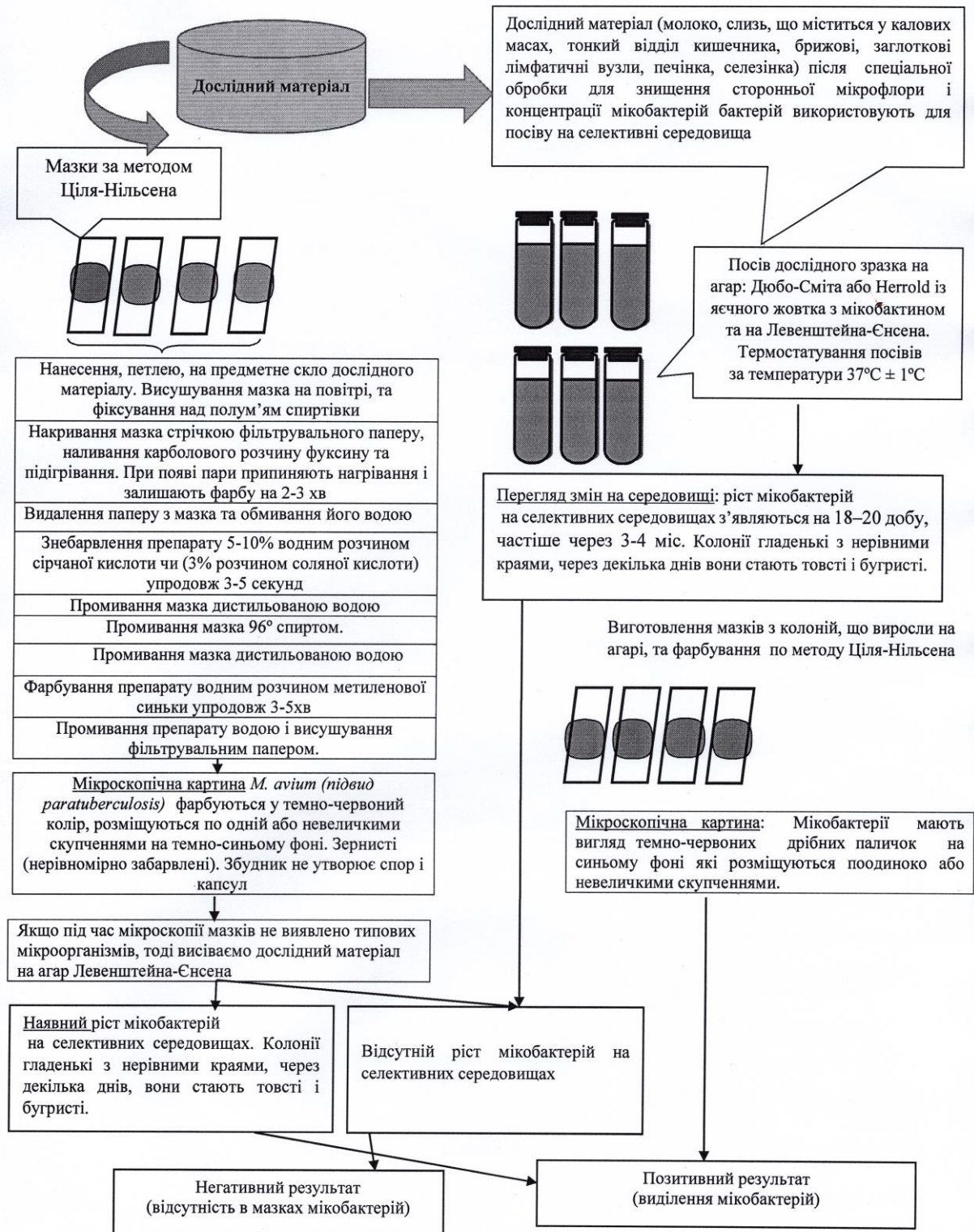
- 1 квадрат – 0 мкг/л;
- 2 квадрат – 1 мкг/л;
- 3 квадрат – 5 мкг/л;
- 4 квадрат – контрольний.



Набір для визначення ніцину:

- Поява жовтого кольору – позитивний результат;
- Безколірний розчин – негативний.

Схема –1. Метод виявлення мікобактерій



ПЩАНСЬКИЙ Олександр Вікторович

кандидат ветеринарних наук,
директор ДНДІЛДВСЕ

АЛЄКСЕЄВА Галина Борисівна

кандидат ветеринарних наук, старший дослідник,
заступник директора з наукового забезпечення лабораторної діагностики
заразних хвороб тварин ДНДІЛДВСЕ

ПІСКУН Антон Володимирович

кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник
науково-дослідного відділу імунологічних досліджень ДНДІЛДВСЕ

КРАВЦОВА Оксана Леонідівна

начальник лабораторії діагностики захворювань бактеріальної етіології
науково-дослідного бактеріологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

ПОЛЩУК Олеся Дмитрівна

завідувач науково-дослідного відділу імунологічних досліджень ДНДІЛДВСЕ

ПІСКУН Олена Олександрівна

кандидат ветеринарних наук, науковий співробітник
лабораторії діагностики захворювань бактеріальної етіології науково-
дослідного бактеріологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

МЄТОЛАПОВА Галина Миколаївна

молодший науковий співробітник
науково-дослідного відділу імунологічних досліджень ДНДІЛДВСЕ

СУЧАСНІ АСПЕКТИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПАРАТУБЕРКУЛЬОЗУ У ЖУЙНИХ ТВАРИН

Методичні рекомендації