

## IMUNOPATOMORFOLOGINIAI GALVIJŲ TUBERKULIOZĖS POKYČIAI

Alius Pockevičius<sup>1</sup>, Petras Mačiulskis<sup>1</sup>, Kazimieras Lukauskas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lietuvos veterinarijos akademija, Fiziologijos ir patologijos katedra, Tilžės g. 18, LT-3022, Kaunas; tel. 8 37 362 923; faks. 8 37 362 417; el.p.: [palius@lva.lt](mailto:palius@lva.lt); [pmaciulskis@vet.lt](mailto:pmaciulskis@vet.lt)

<sup>2</sup>Valstybinė maisto ir veterinarijos tarnyba, Siesikų g. 19, LT-2010, Vilnius; tel. 8 5 2404 361; faks. 8 5 2404 362; el.p.: [klukauskas@vet.lt](mailto:klukauskas@vet.lt)

**Santrauka.** Atlikus 89 galvijų, įtariamų sergant tuberkulioze, patologiinį anatominį tyrimą, tuberkuliozė nustatyta 20 galvijų (22%). Patologinė anatominė tuberkuliozės diagnozė patvirtinta histologiškai, o bakteriologiškai buvo nustatyta *Mycobacterium bovis*. Patologiniu anatominiu tyrimu 85% galvijų tuberkuliozės granulomos rastos bronchų limfiniuose mazguose, 80% galvijų – tarpusienio limfiniuose mazguose, 30% – antrykliniuose, 20% – žarnų pasaito, 5% – pažandiniuose limfiniuose mazguose, 45% – plaučiuose, 5% – kepenyse, 10% galvijų – klubinės žarnos sienelėje. Tuberkulo kazeozinė nekrozė buvo apsupta epitelioidinių ląstelių, gigantiškų Langhanso tipo daugiabranduolių ląstelių, limfocitų. 50% galvijų nekrozės centre nustatyta stipriai išreikšta distrofinė kalcinozė, 35% galvijų distrofinė kalcinozė buvo minimali, o 15% galvijų ji nenustatyta. 85% galvijų limfiniuose mazguose granulomos buvo apgaubtos hialinizuota fibrozinio jungiamojo audinio kapsule, o 15% galvijų kapsulė buvo nesusiformavusi. Audinius ištyrus Cylio-Nilseno, fluorescenciniu ir imunohistocheminiu metodais nustatyta *M.bovis*, tačiau tyrimas imunohistocheminiu ir fluorescenciniu metodu buvo tikslesnis. *M.bovis* infekcija patvirtinta audinius tiriant transmisiniu elektroniniu mikroskopu.

**Raktažodžiai:** galvijai, tuberkuliozė, *M.bovis*, imunopatologiniai pokyčiai.

## IMMUNOPATHOMORPHOLOGY OF BOVINE TUBERCULOSIS

**Summary.** We have performed *post mortem* examination of 89 cattle, which had presumptive diagnosis of tuberculosis via delayed type hypersensitivity response to bovine tuberculin. The gross findings of tuberculosis were detected in 20 cattle (22 %). Diagnosis of tuberculosis was confirmed by histopathological and bacteriological results, from tissues was isolated *Mycobacterium bovis*. Thorough gross examination granulomatous lesions were detected in bronchial lymph nodes (85 % cases of tuberculosis), mediastinal lymph nodes (80 %), retropharyngeal lymph nodes (30 %), mesenteric lymph nodes (20 %), submandibular lymph nodes (5 %), lungs (45 %), ileum (10 %), liver (5 %). Lymphocytes, epithelioid cells, and giant Langhans multinuclear cells surrounded necrosis in tissue. In 50 % cases of tuberculosis granulomatous lesions in the center of necrosis had outspread mineralisation, in 35 % cases mineralisation was minimal, in 15 % cases mineralisation was not found. In 85 % cases of tuberculosis granulomatous lesions were surrounded with capsule of fibro connective tissue, in 15 % cases capsule was not formed. After examination of tissues with tuberculous lesions by methods of Ziehl-Neelsen, fluorescence microscopy and immunohistochemistry, it was found out, that fluorescence microscopy and immunohistochemical methods were more sensitive for *M.bovis* detection. *M.bovis* infection was confirmed by transmission electron microscopy.

**Keywords:** cattle, tuberculosis, *M.bovis*, immunopathomorphology.

**Įvadas.** Tuberkuliozės granulomos dažniausiai randamos plaučiuose, antrykliniuose, pažandiniuose, bronchų, tarpusienio limfiniuose mazguose, rečiau – žarnų pasaito, kepenų limfiniuose mazguose, kepenyse, blužnyje, pilvaplovėje ir kituose organuose (Corner et al., 1990; Corner, 1994; OIE manual, 1996; de Anda et al., 1997; Menzies, Neill, 2000).

Histopatologiniais tyrimais įvertinami imunopatologiniai procesai tuberkuliozės granulomose, nustatomos rūgštims atsparios mikobakterijos. Imunopatologiniai pokyčiai tiriami hematoksilinu ir eozinu dažytuose audiniuose. Mikroskopuojant granulomos centre randama kazeozinė nekrozė, apsupta epitelioidinių ir gigantiškų Langhanso tipo daugiabranduolių ląstelių, limfocitų ir neutrofilų. Sveiki audiniai nuo pažeistų dažniausiai atskirti fibrozinio jungiamojo audinio kapsule, kurios struktūra išryškinama tiriant audinius Masson metodu. Tačiau kartais jungiamojo audinio kapsulė (dažniausiai plaučiuose) gali būti nesusiformavusi, audiniai pažeisti daugiau difuziškai,

neapribotai. Distrofinė kalcinozė dažniausiai randama nekrozės židinio centre (Corner, 1994; Cassidy et al., 1998). Susikaupusioms mineralinėms druskoms išryškinti audiniai tiriami von Kossa metodu (Costa et al., 1988; Thoen et al., 1988; Corner, 1994; Cassidy et al., 1998).

Rūgštims atsparios mikobakterijos nustatomas fluorescenciniu ir Cylio-Nilseno tyrimo metodais. Dažant Cylio-Nilseno metodu audiniuose *M.bovis* bakterijų dažniausiai randama nedaug, todėl tiriant fluorescenciniu ar imunohistocheminiu metodu galima mikroskopuoti mažiau didinančiu objektyvu ir tiksliau patvirtinti tuberkuliozės diagnozę (Costa et al., 1988; Kwee et al., 1989; Massone et al., 1990; Gutierrez Cancela, Garcia Marin, 1993; Cassidy et al., 1998; Githui et al., 1998; Cassidy et al., 1999). Imunohistocheminiu tyrimu nustatyti *M.bovis* naudojamas anti BCŽ serumas, nes žinoma, kad *M.bovis*, BCŽ ir daugumai kitų mikobakterijų antigenams būdingos vienodos antigeninės savybės (Kobayashi et al., 1989; Massone et al., 1990; Gutierrez Cancela, Garcia Marin, 1993). Mikobakterijų

kiekis audiniuose priklauso nuo organizmo imuninio atsako, sukeliančio granulominį uždegimą. Jo zonoje gali būti randami tik suirusių bakterijų antigenai, kurie Cylio-Nilseno tyrimo metodu neaptinkami (Kobayashi et al., 1989; Gutierrez Cancela, Garcia Marin, 1993). Imunohistocheminiu metodu nustatomi mikobakterijų antigenai, fragmentai, gyvos ar žuvusios mikobakterijos, net jei bakterijos sienelė ir pažeista. Antikūnus, susijungusius su antigenu, prijungia žymėtieji antikūnai (antriniai antikūnai), o šie išryškunami fermento-substrato reakcijos metu (Massone et al., 1990; Gutierrez Cancela, Garcia Marin, 1993).

Tiriant audinius transmisiniu elektroniniu mikroskopu atkreipiamas dėmesys į mikobakterijų lokalizacijos vietą, mikobakterijų morfologiją, audinio ląstelinę struktūrą. Mikobakterijos dažnai randamos lizosomose, apie mikobakteriją matoma šviesi juosta, būdinga rūgštims atsparioms bakterijoms (Dickersin, 2000).

Tuberkuliozės diagnozė nustatoma, jeigu audiniuose randamos rūgštims atsparios mikobakterijos ir tuberkuliozei būdingi mikroskopiniai pokyčiai: kazeozinė nekrozė, distrofinė nekrozė, kalcinozė, epitelioidinės ir gigantiškos Langhanso tipo daugiabranduolės ląstelės, makrofagai (OIE, 2000). *M.bovis* tuberkuliozės diagnozei patvirtinti atliekami bakteriologiniai tyrimai. Patologinės medžiagos mėginys imamas iš pakitusių limfinių mazgų ir parenchiminių organų. Tais atvejais, kai galvijams nustatoma teigiama odos alerginė reakcija, tačiau nenustatomi makroskopiniai tuberkuliozės pokyčiai, mėginiai bakteriologiniam tyrimui imami iš antryklinių, bronchų, tarpusienio, tešmens, pažandinių ir kai kurių žarnų pasaito limfinių mazgų (OIE, 2000). Išaugus mikobakterijų kultūroms įvertinamos biocheminės savybės, tepinėlis dažomas Cylio-Nilseno metodu, gali būti atliekamas biologinis bandymas mikobakterijų tipui nustatyti.

**Darbo tikslas** – įvertinti galvijų tuberkuliozės pažeidimų anatinę ir histologinę lokalizaciją, išplitimą, imunopatomorfoloģinius pokyčius.

**Medžiagos ir metodai.** Galvijai, kuriems odos alerginiu tyrimu ar lyginamuoju odos alerginiu tyrimu nustatyta teigiama reakcija, buvo paskersti 1997 – 2002 metais. Tuberkuliozei diagnozuoti atliktas skerdienos ir šių vidaus organų patologinis anatinis tyrimas: migdolinių liaukų, krūtinplėvės, diafragmos, plaučių, pažandinių, antryklinių, bronchų, tarpusienio, kepenų, klubinės – gaubtinės žarnos pasaito, vidinių klubinių, priešmentinių, paviršinių kirkšnies ir tešmens limfinių mazgų, širdies, kepenų, blužnies, kasos, inkstų, pilvaplėvės, žarnų, tešmens. Limfiniai mazgai tirti supjaustyti apie 2 mm storio sluoksniais (Corner et al., 1990; Corner, 1994; Whipple et al., 1996). Atliekant galvijų skerdenų ir vidaus organų patologinį anatinį tyrimą, vertinta limfinių mazgų, vidaus organų spalva, konsistencija, kapsulės įtempimas, pjūvio vaizdas. Tiriant pilvaplėvę, krūtinplėvę vertinta paviršiaus spalva, lygumas, drėgnumas. Nustatytas galvijų organizme rastų tuberkuliozės granulomų dydis, kazeozinės nekrozės išplitimas, anatinė lokalizacija.

Patologiniam histologiniam tyrimui audinių mėginiai (toliau – audiniai) imti iš pažandinių, antryklinių, bronchų, tarpusienio limfinių mazgų arba iš kitų limfinių mazgų ar organų, kuriuose buvo rasti pokyčiai, būdingi tuberkuliozei. Audiniai fiksuoti 10 % neutraliu formalino tirpalu 24 val., plauti tekančiu vandentiekio vandeniu 12 val., vanduo pašalintas etilo alkoholiu, audiniai įlieti į parafiną ir pjaustyti roginiumi mikrotomu. Įliejimui naudotas parafinas, tirpstantis 56°C temperatūroje. Iš kiekvieno mėginio parafininio bloko atpjauti 4 mikrometrų storio audiniai, kurie tirti dažant hematoksilinu ir eozinu, Cylio-Nilseno metodu rūgštims atsparioms bakterijoms nustatyti, auramino rodaminio metodu fluorescenciniam mikobakterijų tyrimui, imunohistocheminiu metodu mikobakterijoms rasti, von Kossa metodu kalciumui ir Masson metodu jungiamajam audiniui nustatyti. Patologiniai histologiniai tyrimai atlikti Lietuvos veterinarijos akademijos Fiziologijos ir patologijos katedros Patologijos skyriuje, Norvegijos veterinarijos mokyklos Patologijos katedroje ir Japonijos nacionalinio gyvulių sveikatingumo instituto Patologijos skyriuje.

Imunohistocheminiam tyrimui buvo paruošta po du kiekvieno galvijo audinių mėginius (vienas mėginys buvo kontrolinis). Audiniai tirti avidino – biotino komplekso peroksidazės metodu. Tyrimui naudotas triušių IgG anti BCŽ (Calmette – Guerin bakterija) serumas, atskiestas 1:5000, ir ABC (G) rinkinys (“Vector” firmos). Imunohistocheminio metodo specifiškumui nustatyti buvo tiriami kontroliniai audiniai, neapdoroti IgG anti BCŽ serumu.

Mikroskopuojant šviesiniu mikroskopu audinius, kuriuose randama mikobakterijų, matomos rusvos granulės – imuniniai kompleksai (antikūnai susijungę su mikobakterijų antigenais).

Audinių, dažytų Cylio-Nilseno metodu, fluorescencinio tyrimo rūgštims atsparioms bakterijoms nustatyti ir imunohistocheminio tyrimo metu tuberkuliozės granulomos 10 matymo laukų (x40 obj., x10 ok.) suskaičiuotos mikobakterijos ir išvestas aritmetinis vidurkis. Granulomos pagal mikobakterijų skaičių viename matymo lauke skirstytos į šias grupes: mikobakterijų nėra; matymo lauke yra iki 2 mikobakterijų; matymo lauke yra 3 – 5 mikobakterijos; matymo lauke yra daugiau kaip 5 mikobakterijos.

Transmisinės elektroninės mikroskopijos tyrimo metodu buvo siekiama nustatyti *M.bovis* formaline fiksuotuose ir į parafiną įlietuose audiniuose, įvertinti mikobakterijos morfologiją. Tyrimui gabaliukai buvo išpjauti iš įlietų į parafiną audinių. Prieš tai audiniai iširti dažant Cylio-Nilseno metodu ir nustatyta mikobakterijų buvimo vieta. Audiniai įlieti į epoksidinę dervą, pjaustyti ultramikrotomu stikliniais peiliais, impregnuoti sunkųjų metalų druskomis.

Tiriant audinius transmisiniu elektroniniu mikroskopu vertinta mikobakterijų lokalizacijos vieta, mikobakterijų morfologija, ląstelinė audinio struktūra (Dickersin, 2000). Šie tyrimai atlikti Japonijos nacionaliniame gyvulių sveikatingumo instituto Patologijos skyriuje. Iš viso iširta

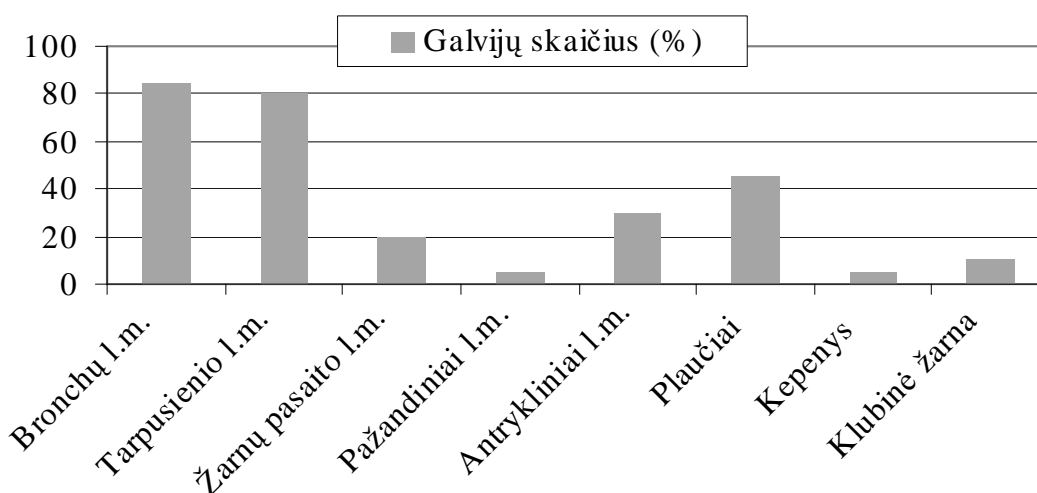
20 galvijų audiniai, kuriuose mikroskopiškai nustatyti tuberkuliozei būdingi pokyčiai ir rūgštims atsparios bakterijos. Audiniai tirti "Hitachi" firmos transmisiniu elektroniniu mikroskopu H-7500, kurio darbinė įtampa yra iki 120 kV.

**Tyrimų rezultatai.** Atlikus 89 galvijų patologinį anatominį tyrimą, tuberkuliozė nustatyta 20 galvijų (22%). Diagnozė patvirtinta histologiškai, o bakteriologiškai nustatyta *M.bovis*.

Patologiniu anatominiu tyrimu 17 (85%) galvijų tuberkuliozės granulomos aptiktos bronchų limfiniuose mazguose, 16 (80%) – tarpusienio limfiniuose mazguose, 6 (30%) – antrykliniuose, 4 (20%) – žarnų pasaito, vienam (5%) – pažandiniuose limfiniuose mazguose, 9 (45%) – plaučiuose, vienam (5%) galvijui – kepenyse, 2 (10%) galvijams – klubinės žarnos sienelėje (1 pav.). 14 (70%) galvijų tuberkuliozės granulomos rastos tarpusienio ir bronchų limfiniuose mazguose, vienam (5%) – antrykliniuose ir pažandiniuose limfiniuose mazguose, 4 galvijams (20%) granulomos nustatytos

plaučių ir žarnų pasaito limfiniuose mazguose. Pažeisti limfiniai mazgai buvo keletą kartų padidėję, standžios konsistencijos. Limfiniuose mazguose rastos nuo kelių milimetrų iki keleto centimetrų diametro tuberkuliozės granulomos, kurių centre buvo gelsva, varškės išvaizdos nekrozinė masė, apgaubta hialinizuota fibrozinio jungiamojo audinio kapsule. Kai kurių tuberkulioze sirgusių galvijų bronchų ir tarpusienio limfiniuose mazguose tuberkuliozės granulomos buvo susiliejusios ir sudarė vientisą nekrozinę masę. 9 (45%) galvijams tuberkuliozės granulomos buvo rastos plaučiuose. Jų dydis kai kada siekė žmogaus kumščio dydį.

Granulomos nustatytos ir plaučių limfiniuose mazguose. Tuberkuliozei būdingi pokyčiai žarnų sienelėje buvo nustatyti 2 galvijams (10%), kepenyse – vienam galvijui (5%), tuberkuliozės granulomos buvo apie 2 cm diametro. Be to, granulomos buvo rastos šių galvijų plaučiuose, jų sritiniuose limfiniuose mazguose ir sritiniuose klubinės žarnos limfiniuose mazguose (2 pav.).



1 pav. Tuberkuliozės granulomų anatominė lokalizacija galvijų organizme (n=20)



2 pav. Susiliejančios tuberkuliozės granulomos karvės plaučiuose

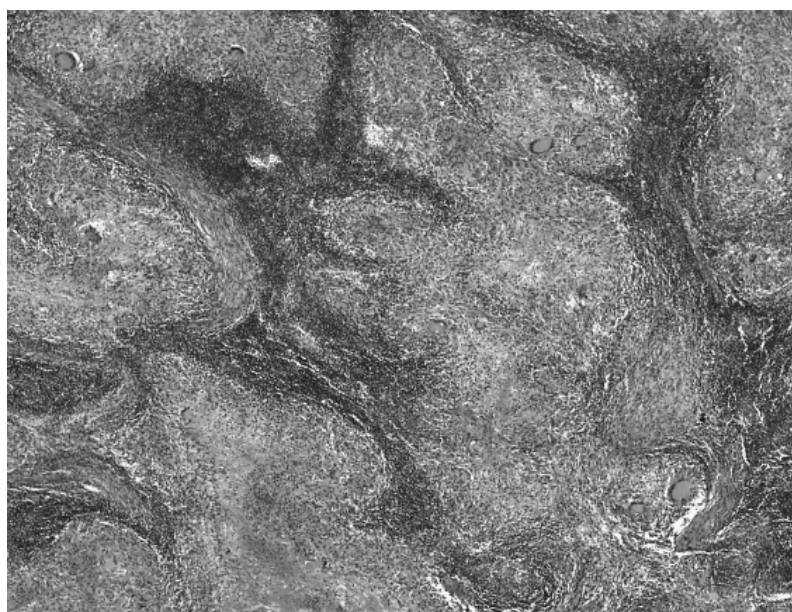
Galvijams, kuriems tuberkuliozės pokyčių nerasta, nustatyti šie patologiniai procesai: blužnies hiperplazija, kepenų fibrozė, lėtinis tulžies latakų uždegimas dėl fascioliozės, lėtinis krūtinplėvės uždegimas, fibrozinis perihepatitas, priekinių plaučių skilčių uždegimas, plaučių, žarnų pasaito, kepenų limfinių mazgų hiperplazija, bronchų limfinių mazgų paraudimas ir hiperplazija, tarpusienio limfinių mazgų hiperplazija, pūlingas paviršinio kaklo limfinio mazgo uždegimas, hipodermozė (1 lentelė).

Mikroskopiškai tuberkuliozės granulomos nustatytos

20 galvijų. Dažant audinius hematoksilinu ir eozinu, išplitusi, susiliejanči kazeozinė nekrozė nustatyta 17 (85%) galvijų, 3 (15%) galvijams kazeozinė nekrozė buvo minimali. Nekrozinė masė buvo ryškiai eozinofiliška ir homogeniška. Kazeozinė nekrozė buvo apsupta epitelioidinių ląstelių, gigantiškų Langhanso tipo daugiabranduolių ląstelių, limfocitų, plazminių ląstelių (3 pav.). 18 (90%) galvijų granulomose rastos gigantiškos Langhanso tipo daugiabranduolės nuo apvalios iki ovalios formos ląstelės, kurios turėjo iki 25 – 30 branduolių; 2 (10%) galvijams daugiabranduolių ląstelių nerasta.

1 lentelė. Patologiniai anatomiciniai pokyčiai rasti priverstinai dėl tuberkuliozės paskerstiems galvijams (n=89)

Patologiniai anatomiciniai pokyčiai	Galvijų skaičius, vnt. (%)
Tuberkuliozės granulomos	20 (22,5%)
Blužnies hiperplazija	7 (7,9%)
Lėtinis krūtinplėvės uždegimas	3 (3,4%)
Kepenų fibrozė	4 (4,5%)
Fibrozinis perihepatitas	1 (1,1%)
Lėtinis tulžies latakų uždegimas dėl <i>Fasciola hepatica</i> invazijos	4 (4,5%)
Plaučių, žarnų pasaito, kepenų limfinių mazgų hiperplazija	2 (2,2%)
Pūlingas paviršinio kaklo limfinio mazgo uždegimas	1 (1,1%)
Plaučių priekinių skilčių uždegimas	2 (2,2%)
Bronchų limfinių mazgų paraudimas ir hiperplazija	1 (1,1%)
Tarpusienio limfinių mazgų hiperplazija	3 (3,4%)
<i>Hypoderma bovis</i> invazijai būdingi pokyčiai	7 (7,9%)



3 pav. Tuberkuliozinis limfadenitas (10x obj.), dažyta hematoksilinu-eozinu

Audinius tiriant von Kossa metodu, 10 (50%) galvijų nekrozės distrofinė kalcinozė buvo išplitusi, 7 (35%) – minimali, o 3 (15%) galvijams distrofinė kalcinozė išvis nenustatyta (4 pav.). Dažniausiai distrofinės kalcinozės vieta nesiekdavo granulomos ląstelių sluoksnio, nors 2 (10%) galvijams nustatyta distrofinė mikrokalcinozė

makrofaguose. 17 (85%) galvijų limfiniuose mazguose granulomos buvo apgaubtos hialinizuota fibrozinio jungiamojo audinio kapsule, o 3 (15%) galvijų – kapsulė nebuvo aiškiai išreikšta. Mikroskopiniai pokyčiai plaučiuose, klubinės žarnos sienelėje ir kepenyse buvo panašūs į pokyčius limfiniuose mazguose, tik plaučiuose

tuberkulai neturėjo aiškiai išreikštos hialinizuotos kapsulės (2 lentelė).

Tuberkulioze nesirgusių galvijų limfiniuose mazguose rasti šie mikroskopiniai pokyčiai: antriniai mazgeliai su germinatyviniais centrais, šerdinių stygų plazmocitozė, šerdinio sinuso histiocitozė, limfocitolizė, eozinofilų infiltracija limfinių mazgų sinusuose, folikulinė limfoma.

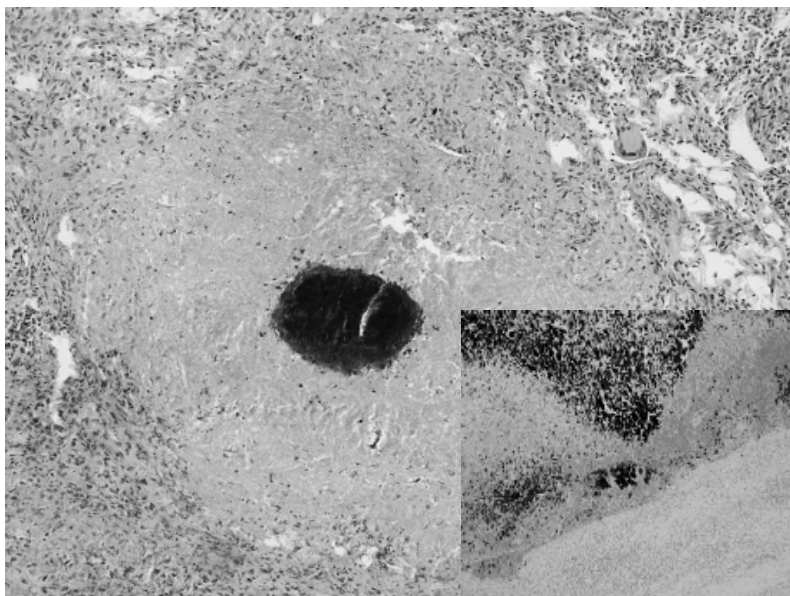
Atlikus lyginamuosius tyrimus Cylio-Nilseno, fluorescenciniu ir imunohistocheminiu metodais 20 galvijų, kuriems tuberkuliozė diagnozuota patomorfologiškai, mikobakterijos nustatytos visais trimis metodais.

Dažant Cylio-Nilseno metodu, 7 galvijų tuberkuliozės granulomose matymo lauke rastos iki 2 mikobakterijų, 11 galvijų – 3 - 5 mikobakterijos, 2 galvijų – daugiau kaip 5 mikobakterijos. Tiriant fluorescenciniu metodu, 5 galvijų granulomose rasta iki 2 fluorescuojančių mikobakterijų matymo lauke, 12 galvijų – 3 - 5 mikobakterijos, o 3 galvijų – daugiau kaip 5 mikobakterijos. Atlikus

imunohistocheminį tyrimą, 3 galvijų granulomose nustatyta iki 2 mikobakterijų matymo lauke, 13 galvijų – 3 - 5 mikobakterijos, 4 galvijų – daugiau kaip 5 mikobakterijos.

Mikobakterijos audiniuose buvo netvarkingai išsisklaidžiusios kazeozinės nekrozės masėje arba uždegiminių ląstelių sluoksnyje - gigantiškose Langhanso tipo daugiabranduolėse ir epitelioidinėse ląstelėse. Mikobakterijų rasta nedaug, nors kelių galvijų tiriamuose audiniuose, kuriuose rastos besiformuojančios granulomos, mikobakterijų nustatyta santykinai daug.

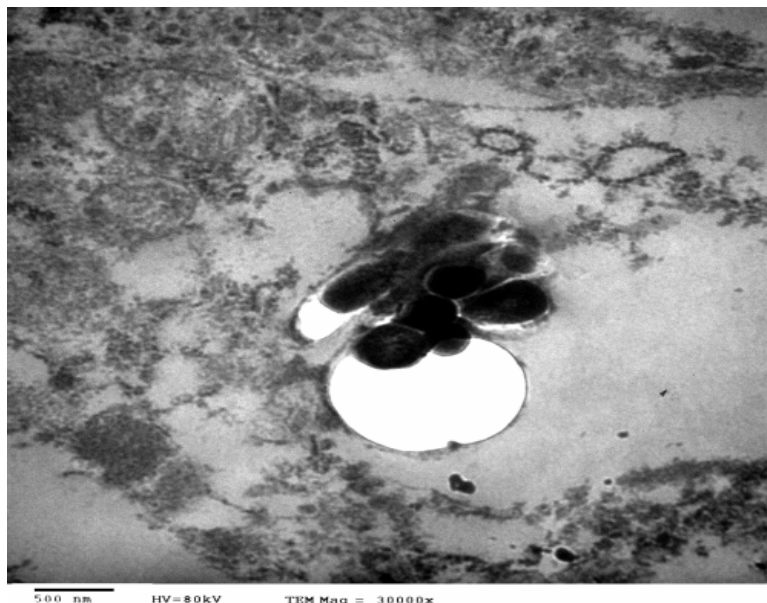
Tiriant audinius transmisiniu elektroniniu mikroskopu nustatytos mikobakterijos, kurių sienelė turi permatomą zoną, būdingą rūgštims atsparioms bakterijoms. Kai kurios mikobakterijos rastos lizosomose, paveiktos lizosomų fermentų (5 pav.). Audinius tiriant transmisiniu elektroniniu mikroskopu, *M.bovis* pavyko rasti ne visuose mėginiuose.



4 pav. Tuberkuliozės granulomos kazeozinės nekrozės distrofinė kalcinozė tarpusienio limfiniame mazge (10x obj.), dažyta hematoksilinu – eozinu; iškarpoje – von Kossa metodu

2 lentelė. Tuberkuliozės granulomos histomorfologija (n=20)

Išplitusi kazeozinė nekrozė	17 (85 %)
Minimali kazeozinė nekrozė	3 (15 %)
Išplitusi distrofinė kalcinozė	10 (50 %)
Minimali kazeozinės nekrozės distrofinė kalcinozė	7 (35 %)
Nėra kazeozinės nekrozės distrofinės kalcinozės	3 (15 %)
Susiformavusi fibrozinio jungiamojo audinio kapsulė	17 (85 %)
Nesusiformavusi fibrozinio jungiamojo audinio kapsulė	3 (15 %)
Yra gigantiškų Langhanso tipo daugiabranduolių ląstelių	18 (90 %)
Nėra gigantiškų Langhanso tipo daugiabranduolių ląstelių	2 (10 %)



5 pav. Mikobakterijos epitelioidinės ląstelės citoplazmoje (transmisinė elektroninė mikroskopija, 30000x)

**Aptarimas ir išvados.** Mūsų tyrimų duomenimis, dažniausiai tuberkuliozės granulomos nustatytos tarpusienio ir bronchų limfiniuose mazguose bei plaučiuose (atitinkamai 85%, 80% ir 45%). Rečiau tuberkuliozės granulomos rastos antrykliniuose, žarnų pasaito, pažandiniuose limfiniuose mazguose, klubinės žarnos sienelėje, vienu atveju – kepenyse. Tuberkulioze sergantiems galvijams granulomos dažniausiai randamos plaučiuose, antrykliniuose, bronchų, tarpusienio limfiniuose mazguose, rečiau – žarnų pasaito, pažandiniuose limfiniuose mazguose, kepenyse, blužnyje (Neill et al., 1994; OIE manual, 1996). Panašius duomenis nurodo Whipple ir kiti tyrinėtojai (1996) nustatę, kad dažniausiai tuberkuliozės granulomos randamos plaučiuose ir jų sritiniuose limfiniuose mazguose (60%) bei galvos limfiniuose mazguose (26,7%). S.D. Neill ir kt. (1994) nustatė, kad natūraliai ir eksperimentiškai užkrėstiems galvijams tuberkuliozės pokyčiai dažniausiai esti plaučių sritiniuose limfiniuose mazguose. Vidutiniškai 57% galvijų, kuriems buvo diagnozuota tuberkuliozė, granulomos rastos bronchų ir tarpusienio limfiniuose mazguose, 23% galvijų – galvos limfiniuose mazguose (antrykliniuose ir pažandiniuose). Meksikoje tiriant galvijų tuberkuliozė, granulomos dažniausiai rastos antrykliniuose limfiniuose mazguose (49,2%), rečiau – tarpusienio (24,4%), pažandiniuose (6,4%), žarnų pasaito limfiniuose mazguose (2,4%). Vidaus organuose tuberkuliozės granulomos aptinkamos rečiau: plaučiuose 0,5%, tešmenyje 0,7%, kepenyse 0,5% (Milian-Suazo et al., 2000). Patologinių morfologinių tyrimų rezultatai ir tuberkuliozės granulomų lokalizacija priklauso nuo galvijų užsikrėtimo *M.bovis* būdo, bakterijų skaičiaus ir virulentiškumo, gyvulio organizmo atsparumo ir laiko, praėjusio po užsikrėtimo (Corner, 1994; de Kantor, Ritacco, 1994; Menzies, 2000). Atsižvelgiant į tuberkuliozės granulomų lokalizaciją vidaus organuose, galima manyti, kad tuberkulioze gyvuliai galėjo užsikrėsti ne tik per kvėpavimo takus, bet ir alimentiniu keliu.

Tuberkuliozės pažeistuose organuose granuloma nustatyta mikroskopiškai. Tuberkuliozės granulomos centre rasta kazeozinė nekrozė, aplink kurią išsidėsčiusios epitelioidinės ir gigantiškos Langhanso tipo daugiabrandoelės ląstelės, limfocitai, plazminės ląstelės ir jungiamasis audinys. Ląstelinis organizmo atsakas neleidžia ligai plisti, susikaupia daug fagocitų, dėl to formuojasi granuloma (Neill et al., 1994). Aktyvuoti makrofagai ir limfocitai išskiria citokinus (navikus nekrozuojantį faktorių, interleukiną 1 beta, gamma interferoną, monocitus pritraukiantį proteiną), kurie skatina ląstelių chemotaksį ir uždegiminių ląstelių, formuojančių granulomą, diferenciaciją (Whipple et al., 1996; Rhyan, Saari, 1995; Palmer et al., 1999). Tuberkuliozės granulomos židinyje veikiama citotoksinių limfocitų ir hidrolizinių fermentų formuojasi kazeozinė nekrozė.

Tiriant audinius, dažytus von Kossa metodu, 17 galvijų (85%) kazeozinėje masėje buvo nustatyta išplitusi distrofinė kalcinozė, todėl uždegiminis procesas organizme galėjo trukti gana ilgai. Audinius tiriant pagal Masson, granulomos buvo apsuptos fibroziniu jungiamuoju audiniu, formuojančiu kapsulę. Fibrozinio jungiamojo audinio formavimasis yra gyvūno organizmo atsakas į persistuojančius antigenus ir yra sąlygojamas citokinų poveikio (Palmer et al., 1999). Plaučiuose jungiamojo audinio kapsulė nebuvo galutinai susiformavusi, todėl uždegiminis procesas lengvai galėjo išplisti. Pagal makroskopinius ir mikroskopinius pokyčius audiniuose (kazeozinės nekrozės ir distrofinės kalcinozės išplitimą, jungiamojo audinio kapsulės susiformavimą bei ląstelinę granulomos struktūrą) galima teigti, kad dalis galvijų sirgo lėtine tuberkulioze.

Mikobakterijų virulentiškumas slypi mikobakterijos sienelės lipiduose. Manoma, kad mikozidai, fosfolipidai ir sulfolipidai apsaugo mikobakteriją nuo fagocitozės. Glikolipidai skatina granulomos vystymąsi ir didina fagocituotų mikobakterijų gyvybingumą, o mikobakterijų

proteinai sukelia uždelstą padidinto jautrumo reakciją (Cassidy et al., 1999; Grange, 1994; Gutierrez Cancela, Garcia Marin, 1993).

Audinius ištyrus Cylio-Nilseno, fluorescenciniu ir imunohistocheminiu tyrimų metodais nustatytos mikobakterijos. *M.bovis* yra smulkios bakterijos, kurių randama negausiai, todėl tiriant audinius, dažytus Cylio-Nilseno metodu, jas sunkiau aptikti negu tiriant fluorescenciniu ir imunohistocheminiu metodu. Be to, Cylio-Nilseno tyrimo metodu nustatomos tik "nepažeistos" mikobakterijos, kai tuo tarpu imunohistocheminiu metodu gali būti aptinkami mikobakterijų antigenai, fragmentai, gyvos ar žuvusios mikobakterijos, net jei bakterijos sienelė ir pažeista (Gutierrez Cancela, Garcia Marin, 1993). Imunohistocheminis tyrimo metodas padeda aptikti *M.bovis* audiniuose, ypač jeigu Cylio-Nilseno dažymo metodu randama mažai mikobakterijų (Massone et al., 1990). Visi trys tyrimų metodai papildo vienas kitą ir kartu juos taikant gaunami tikslesni rezultatai (Githui et al., 1998).

Tiriant transmisiniu elektroniniu mikroskopu rasta *M.bovis*, kurios sienelė turi permatomą zoną, būdingą rūgštims atsparioms bakterijoms. Kai kurios mikobakterijos lizosomose buvo paveiktos jų fermentų. Gana dažnai, mikroskopuojant audinius elektroniniu mikroskopu, greta mikobakterijų rastos tuščios erdmės. Šis artefaktas atsiranda audinius įliejus į epoksidinę dervą (Dickersin, 2000). Tiriant transmisiniu elektroniniu mikroskopu *M.bovis* pavyko nustatyti ne visuose mėginiuose. Audiniuose *M.bovis* koncentracija dažniausiai nedidelė, be to, iš įlietų į epoksidinę dervą audinių, kuriuose yra kazeozinė nekrozė, ne visais atvejais pavyko gauti tyrimui tinkamus pjūvius.

#### Literatūra

- Buddle B.M., de Lisle G.W., Pfeffer A., Aldwell F.E. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. Vaccine. 1995. Vol. 13(12). P. 1123-1130.
- Cassidy J.P., Bryson D.G., Neill S.D. Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. Veterinary Record. 1999. Vol. 144. P. 139-144.
- Cassidy J.P., Bryson D.G., Pollock J.M., Evans R.T., Forster F. and Neill S.D. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. J.Comp.Path. 1998. Vol. 119. P. 27-44.
- Corner L., Melville L., McCubbin K., Small K.J., McCormick B.S., Wood P.R., Rothel J.S. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. Aust. Vet. J. 1990. Vol. 67. P. 389-392.
- Corner L.A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 1994. Vol. 40. P. 53-63.
- Costa H.C., de Souza L.C., Martini J.P., Ferrazoli L., Martins M.C., Opromolla D.V., del Giudice A.C. Comparative study of various staining methods for mycobacteria. Hanselol.Int. 1988. Vol. 13(2). P. 37-41.
- De Anda J.H., Evangelista T.R., Valencia G.L., Hodgers M.M. An abattoir monitoring system for diagnosis of tuberculosis in cattle in Baja California, Mexico. JAVMA. 1997. Vol. 211. P. 709-711.
- De Kantor I.N., Ritacco V. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Veterinary Microbiology. 1994. Vol. 40. P. 5-14.
- Dickersin R.D. Diagnostic Electron Microscopy. A text/atlas. New York. 2000. 1005 p.
- Essey M.A., Koller M.A. Status of bovine tuberculosis in North America. Veterinary Microbiology. 1994. Vol. 40. P. 15-22.

- Githui W., Juma E.S., Obwana D.O., Mwai J., Kwamanga D. A Comparative study on the reliability of the fluorescence microscopy and Ziehl-Neelsen method in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Veterinary microbiology. 1998. Vol. 62. P. 281-290.

- Gonzalez O.R., Gutierrez C.B., Alvarez Nistal D., de la Puente Redondo V.A., Dominguez Rodriguez L., and Rodriguez Ferri E.F. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon gama assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. Veterinary microbiology. 1999. Vol. 70. P. 55-66.

- Gonzalez O.R., Gutierrez C.B., Aranaz Martin A., Liebana Criado E., Dominguez Rodriguez, and Rodriguez Ferri E.F. Comparison of different methods for diagnosis of bovine tuberculosis from tuberculin or interferon gama reacting cattle in Spain. Journal of applied Microbiology. 1998. Vol. 87. P. 465-471.

- Grange J.M. Transmission of *M.bovis* from cattle to man. Veterinary Microbiology. 1994. Vol. 40. P. 137-151.

- Gutierrez Cancela M.M., Garcia Marin J.F. Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. J.Comp.Pathol. 1993. Vol. 109(4). P. 361-370.

- Haagsma J. Working paper on recent advances in the field of tuberculosis control and research. World Health Organization meeting on zoonotic tuberculosis with particular reference to *Mycobacterium bovis*. Geneva. 1993.

- Kwee W.S., Willig A.P., Sturm A.W. Detection of mycobacteria in tissue sections. Ned.Tijdschr.Geneeskd. 1989. Vol. 133. P. 2170-2173.

- Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. OIE. 2000.

- Marangon S., Martini m., Dalla Pozza M., Neto F. A case-control study on bovine tuberculosis in the Veneto region. Prev.Vet.Med. 1998. Vol 34(2-3). P. 87-95.

- Marshall B.G., Wangoo A., Cook H.T. Increased inflammatory cytokines and new collagen formation in cutaneous tuberculosis and sarcoidosis. Thorax. 1996. Vol. 51. P. 1253-1261.

- Massone A.R., Martin A.A., Ibargoyen G.S., Gimeno E.J. Immunohistochemical methods for the visualisation of *M.paratuberculosis* in bovine tissues. Journal of Veterinary Medicine. 1990. Vol. 37. P. 251-253.

- Menzies F.D., Neill S.D. Cattle-to-cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. The Veterinary Journal. 2000. Vol. 160. P. 92-106.

- Neill S.D., Pollock J.M., Bryson D., Hanna J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Veterinary Microbiology. 1994. Vol. 40. P. 41-52.

- Palmer M.V., Whipple D.L., Rhyon J.C., Bolin C.A., Saari D.A. Granuloma development in cattle after intratracheal inoculation with *Mycobacterium bovis*. AJVR. Vol.60, No.3, 1999. P. 310-315.

- Rhyon J.C., Saari D.A. A Comparative Study of the Histopathologic Features of Bovine Tuberculosis in Cattle, Fallow Deer (*Dama dama*), Sika deer (*Cervus nippon*), and Red Deer and Elk (*Cervus elaphus*). Vet.Pathol. 1995. Vol. 32. P. 215-220.

- The Epidemiology of *Mycobacterium bovis* Infections in Animals and Man: a review. Tubercle and lung disease. The official journal of the international union against tuberculosis and lung disease. Aberdeen Ltd, UK. 1995. P. 1-46.

- Thoen C.O., Quinn W.J., Miller L.D., Stachouse L.L., Newcomb B.F., Ferrell J.M. *Mycobacterium bovis* infection in North American (*Cervus elaphus*). J.Vet.Diagn.Invest. 1992. Vol. 4(4). P. 423-427.

- Thoen C.O., Thorlson K.J., Miller L.D., Himes E.M., Morgan R.L. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in American bison. Am. J. Vet. Res. 1988. Vol. 49. P. 1861-1865.

- Wedlock D.N., Aldwell F.E., Collins D.M., de Lisle G.W., Wilson T., Buddle B.M. Immune responses in cattle by virulent and attenuated *Mycobacterium bovis* strains: correlation of delayed-type hypersensitivity with ability of strains to grow in macrophages. Infection and immunity. 1999. Vol. 67. P. 2172-2177.

- Whipple D.L., Bolin C.A., Miller J.M. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. J. Vet. Diagn. Invest. 1996. Vol. 8. P. 351-354.

- Wigle W.D., Ashley M.J., Killough E.M., Cosens M. Bovine tuberculosis in humans in Ontario. Am. Rev. Respir. Dis. 1972. Vol. 106. P. 528-534.

2002-03-0