

Література

1. Житенева Л. Д. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб / Л. Д. Житенева, Т. Г. Полтавцева, О. А. Рудницкая – Ростов–на–Дону: Ростовское издательство, 1989. — 112 с.
2. Житенева Л. Д. Эколого–гематологические характеристики некоторых видов рыб: Справочник / Л. Д. Житенева, Т. Г. Полтавцева, Т. И. Калужная. – Ростов–на–Дону: АзНИИРХ, 1997. – 149 с.
3. Житенева Л. Д. Экологические закономерности ихтиогематологии / Л. Д. Житенева // Ростов–на–Дону: АзНИ–ИРХ, 2000. – 56 с.
4. Крейтцманн Х. Л. Гематологические методы исследований – вклад в диагностическую программу контроля службы здоровья рыб: пер. с нем. Х.Л. Крейтцманн, П.Франке – М.: ЦНИИТЭИРХ, 1983. – 22 с.
5. Кондрахин И. П. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии: справочное издание / И. П. Кондрахин, Н. В. Курилова, А. Г. Малахов и др. – М.: Агропромиздат, 1985. – 115 с.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия. Учеб. пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
7. Лянзберг О. В. Динаміка гематологічних показників корошових риб протягом зимового використання / О. В. Лянзберг, І. М. Шерман / Рибогосподарська наука України. – 2008. – №4. – С.104–107.

References

- Zhiteneva, L. D., Poltavceva, T. G., Rudnickaja, O. A. (1989). Atlas normal'nyh i patologicheski izmenennyh kletok krovi ryb / L. D.Zhiteneva, – Rostov–na–Donu: Rostovskoe izdatel'stvo, 112. (in Russian).
- Zhiteneva, L. D., Poltavceva, T. G., Kaljuzhnaja, T. I. (1997). Jekologo–gematologicheskie karakteristiki nekotoryh vidov ryb: Spravochnik / Rostov–na–Donu: AzNIIRH, 149. (in Russian).
- Zhiteneva, L. D. (2000). Jekologicheskie zakonomernosti ihtiogematologii / L. D. Zhiteneva // Rostov–na–Donu: AzNI–IRH, 56. (in Russian).
- Krejtcmann, H. L. (1983). Gematologicheskie metody issledovanij – vklad v diagnosticheskiju programmu kontrolja sluzhby zdorov'ja ryb: per. s nem. H.L. Krejtcmann, P.Franke – M.: CNIIITeIRH, 22. (in Russian).
- Kondrahin, I. P., Kurilova, N. V., Malahov, A. G. (1985). Klinicheskaja laboratornaja diagnostika v veterinarii: spravochnoe izdanie. M.: Agropromizdat, 115. (in Russian).
- Lakin, G. F. (1990). Biometrija. Ucheb. posobie dlja biol. spec. vuzov. – 4-e izd., pererab. i dop. – M.: Vysshaja shkola, 352. (in Russian).
- Ljanzberg O. V. Dynamika gematologichnyh pokaznykiv koropovyh ryb protjagom zymovogo vykorystannja / O. V. Ljanzberg, I. M. Sherman / Rybogospodars'ka nauka Ukraїny. – 2008. – №4. – S.104–107. (in Ukrainian).

Стаття надійшла до редакції 28.04.2016

УДК 619:616.98:579

Ткаченко О. А., д. вет. н., професор, **Глебенюк В. В.**, к. вет. н., доцент,
Глебенюк О.Г., здобувач ©

*Дніпропетровський державний аграрно–економічний університет,
м. Дніпропетровськ, Україна*

**ЕФЕКТИВНІСТЬ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ЗА
ДЕТЕКЦІЇ ДИСОЦІАТИВНИХ ВАРІАНТІВ MYCOBACTERIUM BOVIS
ШВИДКОРОСЛОГО ШТАМУ**

У статті наведено результати визначення ефективності полімеразної ланцюгової реакції за детекції дисоціативних варіантів M. bovis швидкорослого штаму.

Матеріалом для досліджень були дисоціативні варіанти M. bovis швидкорослого штаму та музейні штами мікобактерій (Vallee, BCG «Шахтар», «Курка»). Морфологію та тинкторіальні властивості мікобактерій

вивчали після виготовлення мазків із колоній і фарбуванням їх за методом Ціля–Нільсена. Для проведення ПЛР використовували ампліфікатор iCycler iQ5 та комплект реагентів для ПЛР–ампліфікації ДНК (*M. tuberculosis*–*M. bovis* complex) з детекцією в режимі реального часу.

У результаті мікроскопічних досліджень встановлено, що дисоціативні варіанти мікобактерій представлені некіслотостійкими поліморфними кокоподібними та паличкоподібними мікроорганізмами.

За результатами ампліфікації ДНК *M. bovis* штамів Vallee, «Шахтар» та BCG було виявлено ДНК–мішені збудника. ДНК дисоціативних варіантів, на відміну від вихідної культури, *M. bovis* швидкорослого штаму не вдалося детектувати.

Генно–молекулярними дослідженнями встановлено генетичні зміни ДНК–мішені дисоціативних варіантів *M. bovis* швидкорослого штаму, що вказує на мутацію збудника туберкульозу за дисоціації.

Ключові слова: мікобактерії, збудник туберкульозу, морфологія, швидкорослий штам, дисоціативні варіанти, музейні штами, ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, детекція, мутація.

УДК 619:616.98:579

Ткаченко А. А., д. вет. н., профессор, **Глебенюк В. В.**, к. вет. н., доцент,
Глебенюк Е. Г., соискатель

*Днепропетровский государственный аграрно–экономический университет,
г. Днепропетровск, Украина*

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ДЕТЕКЦИИ ДИССОЦИАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ *Mycobacterium bovis* БЫСТРОРАСТУЩЕГО ШТАММА

В статье приведены результаты определения эффективности полимеразной цепной реакции при детекции диссоциативных вариантов *M. bovis* быстрорастущего штамма.

Материалом для исследований были диссоциативные варианты *M. bovis* быстрорастущего штамма и музейные штаммы микобактерий (Vallee, BCG «Шахтар», «Курка»). Морфологию и тинкториальные свойства микобактерий изучали после приготовления мазков из колоний и окраской их по методу Ціля–Нільсена. Для проведения ПЦР использовали Амплификатор iCycler iQ5 и комплект реагентов для ПЦР–ампліфікації ДНК (*M. tuberculosis*–*M. bovis* complex) с детекцией в режиме реального времени.

В результате микроскопических исследований установлено, что диссоциативные варианты микобактерий представлены некіслотоустойчивыми поліморфними кокоподібними и паличковидными микроорганизмами.

По результатам ампліфікації ДНК *M. bovis* штаммів Vallee, «Шахтар» и BCG было обнаружено ДНК–мішені возбудителя. ДНК диссоціативних варіантів, в отличие от исходной культуры, *M. bovis* быстрорастущего штамма не удалось детектировать.

Генно–молекулярными исследованиями установлены генетические изменения ДНК–мішені диссоціативних варіантів *M. bovis* быстрорастущего штамма, что указывает на мутацию возбудителя туберкулеза при диссоциации.

Ключевые слова: микобактерии, возбудитель туберкулеза, морфология, быстрорастущий штамм, диссоциативные варианты, музейные штаммы, ДНК, полимеразная цепная реакция, детекция, мутація.

UDC 619:616.98:579

Tkachenko O.A., Glebenyuk V.V., Glebenyuk O.G.,
Dnipropetrovsk state agro–economic university, Dnipropetrovsk, Ukraine

**EFFICIENCY BY PCR DETECTION DISSOCIATIVE VARIANTS
MYCOBACTERIUM BOVIS QUICKLY GROWING STRAIN**

The results determine the effectiveness PCR for detection M. bovis dissociative variants quickly growing strain.

Material for research were dissociative variants M. bovis quickly growing strain and museum strains mycobacterium (Vallee, BCG «Шахтар», «Курка»). Morphology and tinctorial properties mycobacterium studied after making smears from colonies and staining them by y Ziehl–Neelsen method. Used to perform PCR thermocyclers iCycler iQ5 and reagents for PCR amplification DNA (M. tuberculosis–M. bovis complex) with detection in real time.

As a result of microscopic studies found that dissociative variants mycobacterium are polymorphic acid–nonproof coccus and sticks bacteria.

The results amplification DNA of M. bovis strain Vallee, BCG «Шахтар» DNA was detected target causative agent tuberculosis. DNA dissociative variants, unlike the original culture of M. bovis quickly growing strain could not be detected.

Found genetic changes in the DNA target dissociative variants M. bovis quickly growing strain, indicating a mutation of Mycobacterium tuberculosis in the dissociation.

Key words: *mycobacterium, the causative agent tuberculosis, morphology, quickly growing strain, dissociative variants, museum strains, DNA, polymerase chain reaction, detection, mutation.*

Вступ. Останнім часом все частіше визначення наявності ДНК *M. bovis* і *M. tuberculosis* у біологічному матеріалі від інфікованих та хворих на туберкульоз тварин проводиться за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Серед сучасних генетичних технологій метод полімеразної ланцюгової реакції займає особливе місце. Цей метод дозволяє провести виявлення збудника або генетичної мутації [3, 4].

Найбільш поширена форма мінливості мікобактерій туберкульозу – дисоціація, тобто виникнення в популяції мікроорганізмів особин, які відрізняються від вихідного типу (виду) зовнішнім виглядом і структурою колоній, а також нащадково закріпленими змінами деяких морфологічних ознак та біохімічних і фізіологічних властивостей, зі збереженням головних таксономічних ознак конкретного виду [2, 3].

Багаторічні дослідження морфологічних, культуральних, патогенних та сенсibiliзувальних властивостей дисоціативних форм *M. bovis* вказують на суттєві їх зміни. Тривале пасажування збудника туберкульозу через живильне середовище призвело до втрати вірулентності, кислотостійкості, зміни метаболізму, ферментативної активності, набуття здатності до пігментоутворення, росту за 3 °С, на м'ясо–пептонному агарі і бульйоні та ін. [1, 5, 6]. Тому вивчення генетичних ознак змінених, у тому числі дисоціативних, мікобактерій лишається актуальним.

Метою нашої роботи було визначення ефективності полімеразної ланцюгової реакції за детекції дисоціативних варіантів *M. bovis* швидкорослого штаму.

Матеріали і методи. Матеріалом для досліджень були дисоціативні (240А, 240Б, 240В, 240/118) та вихідний варіанти *M. bovis* швидкорослого штаму. В якості контролю використовували *M. bovis* музейних штамів (Vallee, BCG «Шахтар») та *M. avium* штаму «Курка».

Морфологію та тинкторіальні властивості мікобактерій вивчали після виготовлення мазків із колоній і фарбуванням їх за методом Ціля–Нільсена [3].

Для проведення детекції ДНК мікобактерій попередньо накопичували біомасу культури на живильному середовищі з рН 7,0–7,2 за 3 (дисоціативні варіанти) та 37 °С (вихідний варіант та музейні штами) впродовж 30 діб із часу появи росту і готували 0,2 см³ завис мікобактерій у концентрації 1 мг/см³.

Для проведення ПЛР використовували ампліфікатор iCycler iQ5 (виробник Bio–Rad, США) та комплект реагентів для ПЛР–ампліфікації ДНК (*M. tuberculosis*–*M. bovis* complex, у тому числі штаму BCG) з детекцією в режимі реального часу («МИКО–

ГЕН», виробник НУО ДНК–технологія, Російська Федерація). Режим ампліфікації наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Програма ампліфікації ДНК мікобактерій			
№ циклу	Кількість повторів	Час	Температура, °С
1	1	1 хв	80
		1 хв 30 сек	94
2	5	30 сек	94
		45 сек	64
3	45	10 сек	94
		45 сек	64

Результати досліджень. У результаті досліджень було встановлено, що за мікроскопії мазків, зафарбованих методом Ціля–Нільсена, виготовлених із колоній вихідного варіанту *M. bovis* швидкорослого штаму у полі зору мікроскопу виявлялися кислотостійкі короткі палички. Дисоціативні варіанти мікобактерій були представлені не кислотостійкими поліморфними кокоподібними та паличкоподібними мікроорганізмами. За мікроскопічних досліджень бактеріальних препаратів, виготовлених із колоній *M. bovis* музейних штамів (Vallee, BCG «Шахтар») спостерігалися червоні товсті короткі палички, а із колоній *M. avium* – червоні тонкі поліморфні палички.

За результатами ампліфікації ДНК *M. bovis* штамів Vallee, «Шахтар» та BCG було виявлено ДНК–мішені збудника (табл. 2).

Як видно з табл. 2, ДНК дисоціативних варіантів, на відміну від вихідної культури, *M. bovis* швидкорослого штаму не вдалося детектувати.

Таблиця 2

Результати ампліфікації ДНК мікобактерій		
Вид мікобактерій	Штам (дисоціативний варіант) мікобактерій	Результат детекції продуктів ампліфікації
<i>M. bovis</i>	швидкорослий (вихідний варіант)	+
	швидкорослий (240А)	–
	швидкорослий (240Б)	–
	швидкорослий (240В)	–
	швидкорослий (240/118)	–
	Vallee	+
	«Шахтар»	+
<i>M. avium</i>	BCG	+
	«Курка»	–

Таким чином, генно–молекулярними дослідженнями встановлено генетичні зміни ДНК–мішені дисоціативних варіантів *M. bovis* швидкорослого штаму, що вказує на мутацію збудника туберкульозу за дисоціації.

Висновок. Дисоціативні варіанти *M. bovis* швидкорослого штаму не детектуються до комплексу *M. tuberculosis–M. bovis* методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу внаслідок мутації мікроорганізмів.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні генетичного коду дисоціативних мікобактерій.

Література

1. Аспекти морфогенезу та біологічні властивості *M. bovis* дисоціативних форм за різних температур культивування / О. А. Ткаченко, І. М. Шендрік, В. В. Місків, А. В. Ковальов // Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун–ту. – 2013. – № 1. – С. 74–83.
2. Вейсфейлер Ю. К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулёза и атипичные микобактерии / Ю.К. Вейсфейлер. – Будапешт: Изд–во АН Венгрии, 1975. – 336 с.

3. Лабораторна діагностика туберкульозу тварин: практичний посібник / [Ткаченко О. А., Білан М. В., Захарський В. В., Ковальова Л. О.]. – Дніпропетровськ: Вид-во «Свідлер А. Л.», 2010. – 208 с.

4. Скрыпник А.В. Применение молекулярно–генетических методов для изучения видового соотношения микобактерий, изолированных в Украине от реагировавшего на туберкулин КРС / А. В. Скрыпник // *Вет. патология.* – 2007. – № 4. – С. 111–117.

5. Ткаченко О. А. Вплив температури культивування на вірулентність мікобактерій / О. А. Ткаченко, В. В. Глебенюк // *Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту.* – 2008. – № 2. – С. 112–114.

6. Ткаченко О. А. Вплив пасажу через морських свинок на біологічну активність та ліпідний склад *M. bovis* швидкорослого штаму / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Глебенюк // *Науковий вісник Львівського НУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького.* – 2008. – Т. 10, № 2 (37), Ч. 2.– С. 2628–267.

References

Tkachenko, O., Shendryk, I., Miskiv, V., Kovalov, A. (2013). Aspekty morfohenezu ta biolohichni vlastyivosti *M. bovis* dysotsiatyvnykh form za riznykh temperatur kultyvuvannia / *Visnyk Dnipropetr. derzh. ahrar. un-tu.* 1, 74–83. (in Ukrainian).

Veisfeiler, Iu. K. (1975). Byolohyia y yzmenchyvost mykobakteryi tuberkuloza y atyupychnye mykobakteryy / *Budapesht: Yzd-vo AN Venhryy,* 336. (in Russian).

Tkachenko, O. A., Bilan, M. V., Zazharskyi, V. V., Kovalova, L. O. (2010). Laboratorna diahnozyka tuberkulozu tvaryn : praktychnyi posibnyk / *Dnipropetrovsk : Vyd-vo «Svidler A.L.»*, 208. (in Ukrainian).

Skrpnyk, A. V. (2007). Prymenenye molekuliarno–henetycheskykh metodov dlia yzucheniya vydovoho sootnosheniya mykobakteryi, yzolyrovannukh v Ukrainy ot reahirovavsheho na tuberkulyu KRS / *Vet. patolohyia.* 4, 111–117. (in Russian).

Tkachenko, O. A., Hlebeniuk, V. V. (2008). Vplyv temperatury kultyvuvannia na virulentnist mikobakterii / *Visnyk Dnipropetr. derzh. ahrar. un-tu.* 2, 112–114. (in Ukrainian).

Tkachenko, O. A., Bilan, M. V., Hlebeniuk, V. V. (2008). Vplyv pasazhu cherez morskykh svynok na biolohichnu aktyvnist ta lipidnyi sklad *M. bovis* shvydkorosloho shtamu / *Naukovyi visnyk Lvivskoho NUVM ta BT im. S. Z. Hzhyskoho.* – Т. 10, № 2 (37), 2, 2628–267. (in Ukrainian).

Стаття надійшла до редакції 1.04.2016

УДК 636.22/.28.09:618.11:616–085

Федоренко С. Я., к. вет. н., доцент *©

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

СПОСІБ ТЕРАПІЇ КОРІВ З ГОНАДОДИСТРОФІЄЮ

Проведеними дослідженнями встановлено, що за дефіциту в організмі корів β-каротину, вітаміну А та цинку зростає концентрація вільнорадикальних окислів (малонового діальдегіду) та знижується вміст антиоксидантів – каталази, супероксиддисмутази і відновленого глутатіону. Це супроводжується розвитком дистрофії тканин яєчників та яйцеклітин зокрема.

У яєчниках корів при гонадодистрофією встановлено зменшення кількості примордіальних фолікулів, разом з тим збільшується кількість фіброзних тіл. Також за дистрофічних процесів у яєчниках спостерігали дезінтеграцію фолікулів на всіх етапах розвитку, порушення цілісності їх оболонки. При цьому відмічається зменшення тинкторіальних властивостей везикулярних фолікулів.

Такі зміни гонад у корів завершуються атрезією фолікулів – дегенеративних процесів, які призводять до руйнування яйцеклітини та навколо розміщених неї структур. Гонадодистрофія у корів проявляється неповноцінними статевими циклами, що призводить до неплідності тварин.

Відомі фактори виникнення та розвитку дистрофії яєчників у корів гіпотетично можна доповнити існуванням порушень, збоїв у системі антиоксидантного захисту.

* Науковий консультант – д.б.н., проф. Кошевой В.П.

© Федоренко С. Я., 2016