

UDC 619:636.22/.28:616.98:579
© 2018

V.V. GLEBENYUK,
PhD in veterinary sciences

*Dnipro State
Agrarian and Economic University,
Ukraine*

E-mail: hlebeniuk.v.v@dsau.dp.ua

Sergey Efremov str., 25, Dnipro

**CONTROL OF THE WELLBEING
RELATIVE TO TUBERCULOSIS
OF THE HORNED CATTLE
BY THE RESULTS
OF PATHOLOGOANATOMICAL
AND MICROBIOLOGICAL
INVESTIGATIONS**

*Показано, що післязабійний огляд туш і внутрішніх органів тварин дозволяє контролювати епізоотичну ситуацію на благополучних щодо туберкульозу територіях. Матеріалом для досліджень слугував біологічний матеріал (шматочки легень, бронхіальні лімфатичні вузли) з невизначеним щодо туберкульозу характером патологоанатомічних змін, який відібрали спеціалісти ветеринарної медицини одного з районів Дніпропетровської області на приватному забійному пункті. Під час мікроскопічного та бактеріологічного досліджень біоматеріалу отримано негативний результат. Лабораторні тварини були еваназовані по закінченні досліду з наявними туберкульозними патологоанатомічними змінами внутрішніх органів. За гістологічного дослідження біоматеріалу від морських свинок встановлено, що в тканині селезінки наявні зливні вогнища і ділянки казеозного некрозу з гранульоматозною реакцією навколо. Гранульоми мали специфічний характер і притаманну для туберкульозного процесу будову. У лімфатичних вузлах відмічено казеозний лімфаденіт. Тканина легень – зі зниженою повітряністю за рахунок розростань фіброзної та грануляційної тканин з наявністю вогнищ казеозного некрозу, які оточені шаром епітеліоїдних клітин, макрофагів з домішками лімфоцитів та плазматичних клітин. Серед епітеліоїдних клітин реєструвалися гігантські багатоядерні клітини Пірогова-Лангханса. Виділено культуру мікобактерій, ріст якої спостерігався з 35-ї доби у вигляді колоній округлої форми з випуклою гладенькою поверхнею та рівними краями (S-форма) кольору слонової кістки. У мазках із колоній культур, після фарбування за Цілем-Нільсеном, реєструвалися кислотостійкі короткі товсті палички довжиною 0,5–1,0 і шириною 0,2–0,3 мкм без вираженої грануляції. Генно-молекулярними дослідженнями встановлено наявність ДНК-мішені в біологічному матеріалі. Виділену культуру мікобактерій ідентифіковано як *Mycobacterium bovis*.*

*Ключові слова: туберкульоз, велика рогата худоба, Дніпропетровська область, патологоанатомічні зміни, мікробіологічне дослідження, *Mycobacterium bovis*.*

Introduction. The tuberculosis of the horned cattle is an actual problem of veterinary medicine in a number of Eastern European countries, including Ukraine. Measures for the prevention and elimination of the disease cause significant economic losses to the owners of the animals [5].

In consequence of carrying out large-scale antituberculous measures, the territory of the Dnipropetrovsk region is considered to be wellbeing in relation to tuberculosis of horned cattle [9].

The wellbeing of population of the animals can be controlled by the results of pathoanato-

mical investigations and veterinary and sanitary examinations at meat processing enterprises. The use of post-livestock slaughter examination of carcasses and internal organs of the animals is considered to be most effective and reliable in establishing the initial diagnosis of the tuberculosis. In the case of the detection of typical pathology changes for tuberculosis, the diagnosis is considered to be established, and at the emergence of difficulties in determining the nature of the changes the biological material from animals is sent to the laboratory for bacteriological investigations [6].

Pathomorphological changes at tuberculosis are characterized by the formation of granulomas (tubercles) in different organs and tissues. At histological examination in tissues found cells with necrotized center, which are surrounded by a zone of epithelial, separate giant and lymphoid cells and a connective tissue capsule [4].

Dissociational and L-shaped mycobacteria may not cause typical pathological anatomical changes for tuberculosis, but productive paraspecific and very rarely necrotic changes that are characterized by inflammatory foci with the presence of gigantic Pirogov-Langhans cells typical for infectious granulomas are found in different organs [2].

The purpose of our work was to control the wellbeing relative to tuberculosis by means of the pathoanatomical and microbiological investigations.

Material and methods. Microbiological investigations were carried out during 2016–2017 on the basis of the microbiological laboratory of the Department of Epizootology and Infectious Animal Diseases of the Dniprovskiy State Agrarian and Economic University.

As material for investigations was biological material (bits of lungs, bronchial lymph nodes) with uncertainties about tuberculosis by the nature of pathoanatomical changes, which was selected by specialists of veterinary medicine in one district of the Dnipropetrovsk region at a private slaughter point.

Presowing processing of the biological material from the animal was carried out by the method of A.P. Alikaieva (1950). The bits of the lungs and lymph nodes were shredded with scis-

sors to a size of 0,5 cm³, transferred to a mortar and poured into a 6 % solution of sulphuric acid. After 10–15 minutes, the acid was poured out, and the investigated material was washed several times with the sterile physiological solution. After removing the residual sulphuric acid, a small amount of the saline solution was poured into the mortar and triturated until a homogeneous slurry was obtained. By means of microbial loop the obtained slurry transferred to the nutrient medium (pH = 7,0–7,2) using 6–10 tubes. Sown vials were placed in a thermostat at 37 °C. Tested tubes were reviewed within three months [7].

We noticed the time of appearance of growth, described the shape and color of the colonies; morphology and tincture properties of mycobacteria in preparations painted according to the Ziehl-Nielsen method; intensity of growth – on a dense egg medium at different temperature of cultivation (20–22 °C, 37 and 45 °C) on meat-peptone agar, on the medium with sodium salicylate; Catalase activity – by Kubica G.P. et al. (1960); resistance to 5 % sodium chloride by Kestle D. et al. (1967); hydrolysis of TWEEN-80 by the Wayne G. method (1962); Reduction of nitrates by Tsukamura M. et al. (1966).

Determination of the pathogenicity and sensitizing properties of mycobacteria was carried out using a biological test [7]. For this, three guinea pigs was infected by suspension of the biological material subcutaneously in the inguinal region. The animals of control were non-infected. The guinea pigs were observed for 90 days. At the end of the experiment, the animals were euthanized, were selected bits of the spleen and lungs and were investigated by the bacteriological, histological and molecular genetic methods.

For carrying out polymerase chain reaction (PCR) have been used amplifier iCycler iQ5 (producer Bio-Rad, USA) and a set of reagents for PCR-amplification of DNA (*M. tuberculosis*-*M. bovis* complex, including BCG strain) with real-time detection (“MIKO-GEN”, the producer is Non-governmental organization (NGO) DNA-technology, Russian Federation).

For histological investigations the selected material was fixed with 10 % neutral forma-

lin solution. Paraffin slices were made on a sledge microtome and stained with hematoxylin-eosin [3].

Results and discussion. The negative result was obtained during the microscopic and bacteriological investigations of the biological material selected from the cow.

In the guinea pigs, infected with the suspension of the biological materials, after 7–10 days, an ulcer was formed, progressing exhaustion was observed. The laboratory animals at 30 days and 60 days after infection responded to the introduction of an allergen (Fig. 1). One guinea pig died on day 89 and at the autopsy, there were observed the specific tuberculosis changes (Fig. 2).

The other two animals were euthanized at the end of the experiment, also, with available tuberculous pathoanatomical changes in the internal organs.

As a result of the bacteriological investigation of the biological material from the laboratory animals, a culture of mycobacteria was isolated, whose growth was observed from the 35th day in the form of rounded colonies with a convex smooth surface and even edges (S-shape) of ivory color.

The isolated culture did not grow at room temperature and temperature 45 °C, on meat-peptone agar, in the egg medium with 5 % sodium chloride and in the medium with sodium salicylate. It did not reduce the nitrates and did not hydrolyze with the TWEEN-80.

In the smears from colonies of the cultures, after painting by Ziehl-Nielsen method, have been observed acidresistant thick short-length bacilli, with the length of 0,5–1,0 microns and 0,2–0,3 microns in width without evident granulation. In addition, in smears of culture, there were also coccoid forms.

By means of the genic and molecular investigations have been established the presence of a DNA target in the biological material of the laboratory animals.

According to the histological investigations, it was found that in the spleen tissue there are drainage foci and sites of caseous necrosis with granulomatous reaction around. The granulomas had the specific character and the characteristic structure for the tuberculous process. The caseous lymphadenitis was noted in lymph nodes.

There was a total caseous necrosis of lymphoid tissue, granulation tissue on the inner surface of the fibrous capsule contained a large number of the epithelioid cells, macrophages with admixture of lymphocytes, fibroblasts, multi-core cells, including giant multinucleated cells of the Pirogov-Langhans type.

The tissue of the lungs was with reduced airiness at the expense of the expansion of fibrous and granulation tissue with the presence of foci of caseous necrosis, which are surrounded by a layer of epithelial cells, macrophages with admixture of lymphocytes and plasmatic cells. Among the epithelioid cells were gigantic multinucleated cells of the Pirogov-Langhans type.



Fig. 1. Positive reaction at the site of allergen injection for 60 days

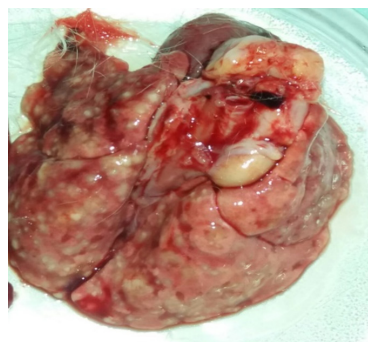


Fig. 2. Tuberculosis – specific pathoanatomical changes in the lung of the guinea pig

In the outer parts of cell infiltrates there were polynuclear leukocytes and fibroblasts.

Thus, in accordance with the results of the microbiological investigations was isolated the culture of micobacteria, identified as *Mycobacterium bovis*.

The obtained results coincide with our preliminary results and confirm that the laboratory diagnosis of tuberculosis should be comprehensive and based on both the basic and additional methods of the investigations [1, 8, 10].

Conclusions

1. The use of post-livestock slaughter investigation of the carcasses and internal organs of the animals allows controlling the epizootic situation in the areas wellbeing in relation to the tuberculosis.

2. The comprehensive microbiological investigations of the biological material with uncertainty regarding tuberculosis by the nature

of pathoanatomical changes from the animals establishes the etiological structure of the tuberculosis of the horned cattle.

Prospects for further research are to further control the epizootic situation regarding tuberculosis of the horned cattle in the Dnipropetrovsk region.

References

1. Глебенюк В.В. Видова належність мікобактерій, виділених від тварин Дніпропетровської області / В.В. Глебенюк, К.В. Теліженко // Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. – 2015. – Т. 3, № 1. – С. 61–64. – Режим доступу: <http://biosafety-center.com/2015-3-%E2%84%961/>.
2. Глебенюк В.В. Мікроструктурні зміни органів морських свинок, заражених дисоціативними варіантами *Mycobacterium bovis* швидкорослого штаму / В.В. Глебенюк, О.Г. Глебенюк, Ю.О. Верченко // Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету. – 2016. – № 2(40). – С. 62–65.
3. Горальський Л.П. Основи гістологічної техніки і мофрфункціональні методи досліджень у нормі та при патології / Л.П. Горальський, В.Т. Хомич, О.І. Кононський. – Житомир: Полісся, 2005. – 288 с.
4. Івченко В. Варіабельність патолого-анатомічних змін та причини рецидивів захворювання великої рогатої худоби на туберкульоз в оздоровлених господарствах / В. Івченко, І. Папченко, О. Горбатюк // Ветеринарна медицина України. – 2005. – № 7 – С. 11–13.
5. Туберкулёз животных и меры борьбы с ним / [Ю.Я. Кассич, А.Т. Борзяк, А.Ф. Кочмарский и др.]; под ред. Ю.Я. Кассича. – К.: Урожай, 1990. – 304 с.
6. Кочмарський В. Метод контролю епізоотичної ситуації щодо туберкульозу за результатами післязабійних досліджень туш великої рогатої худоби / В. Кочмарський // Ветеринарна медицина України. – 2002. – № 6. – С. 14–15.
7. Настанова по діагностиці туберкульозу / В.М. Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко та ін. – К., 1994. – 39 с.
8. Ткаченко О.А. Ефективність полімеразної ланцюгової реакції за детекції дисоціативних варіантів *Mycobacterium bovis* швидкорослого штаму / О.А. Ткаченко, В.В. Глебенюк, О.Г. Глебенюк // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. – 2016. – № 1(65), т. 18. – С. 185–189.
9. Лабораторна діагностика туберкульозу тварин: практичний посібник / [Ткаченко О.А., Білан М.В., Зажарський В.В., Ковальова Л.О.]. – Дніпропетровськ: Вид-во “Свідлер А.Л.”, 2010. – 208 с.
10. Біологічна активність епізоотичних та музейних штамів *M. bovis* / О.А. Ткаченко, Н.Г. Усєєва, В.В. Глебенюк, О.М. Кулішенко // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. – 2007. – № 3(34), ч. 1, т. 9. – С. 218–224.