

Результати проведеної ампліфікації ДНК мікроорганізмів роду *Aeromonas* з використанням пари праймерів АНН1F та АНН1R свідчили про те, що обрана пара праймерів є некоректно сформованою та не дозволяє визначити специфічні ДНК-продукти для детекції фрагмента гена, відповідального за синтез гемолізіну.

**Висновки.** Таким чином, було оптимізовано метод молекулярно-генетичної діагностики аеромонозу риб, який заснований на індикації специфічних локусів 16S рибосомної ДНК мікроорганізмів роду *Aeromonas*; оптимізовано метод визначення патогенності аеромонад, заснований на індикації гена, що кодує синтез аеролізіну (*aerA*). Отримані результати свідчать про можливість використання пар праймерів А16SF – А16SR та АН-*aerA*AF – АН-*aerA*AR для розробки ПЛР тест-системи для діагностики аеромонозу риб.

Список літератури

1. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2009. OIE, World Organization for Animal Health, Paris, 2010. – 383 pp.
2. ПЛР-діагностика бактеріальних захворювань риб аеромонадної етіології [Текст] / Б. Т. Стегній [та ін.] // Вет. медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2008. – Вип. 90. – С. 413-420.
3. Полімеразно-ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини [Текст] / Б. Т. Стегній [та ін.]. – Х.: ННЦ «ІЕКВМ», 2006. – 110 с.
4. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays [Text] / A. Cascon [et al.] // Appl. and Environ. Microbiology. – 1996. – Vol. 62, № 4. – P. 1167-1170.
5. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences [Text] / E. Dams [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1988. – Vol. 16. – P. 87-175.
6. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. [Text] / C.I.B. Kingombe [et al.] // Appl. Environ. Microbiology. – 1999. – Vol. 65, № 12. – P. 5293-5302.
7. Molecular cloning and characterization of an extracellular protease gene from *Aeromonas hydrophila* [Text] / O. Rivero [et al.] // Journ. of Bacteriology. – 1990. – Vol. 172, № 7. – P. 3905-3908.
8. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR [Text] / G. Wang [et al.] // Journ. of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 41, № 3. – P. 1048-1054.
9. Characterization of cytotoxic, hemolytic *Aeromonas caviae* clinical isolates and their identification by determining presence of a unique hemolysin gene [Text] / G. Wang [et al.] // J. of Clin. Microbiology. – 1996. – Vol. 34, № 12. – P. 3203-3205.

**DIAGNOSIS of fish aeromonosis using the polymerase chain reaction**

**Yevtushenko A.V., Bezkravna N.V., Gerilovych A.P., Solodyankin O.S.**

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

*There has been optimized the method of molecular-genetic diagnosis of fish aeromonosis, which is based on the indication of specific loci of 16S ribosomal DNA of microorganisms genus Aeromonas, and method of determining their pathogenicity, based on the indication of a gene that encodes the aerolysin synthesis (*aerA*).*

УДК 619:614.48:579.873.21

**УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ АТИПОВИХ МІКОБАКТЕРІЙ ПІСЛЯ ДІЇ «ХЛОРАНТОЇНУ»**

**Заггородній А.І., Палій А.П.**

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків*

**Загребельний В.О.**

*Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ*

**Репін М.В.**

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків*

На сьогодні в практичній ветеринарній дезінфектології накопичений великий досвід, який широко використовується в сільському господарстві. Розвиток агропромислового комплексу нашої країни змінює вимоги до практичних і теоретичних аспектів в дезінфектології, що полягає в пошуку нових високоєфективних нетоксичних препаратів, перегляд багатьох існуючих режимів і технологій санації об'єктів ветеринарного нагляду. Вирішення поставлених задач вимагає проведення глибоких теоретичних досліджень щодо закономірності загибелі бактерій та основ їх природної стійкості, механізму дії хімічних чинників, що тісно пов'язано з вивченням біології збудників інфекційних хвороб тварин.

Не дивлячись на досягнутий успіх у боротьбі з інфекційними захворюваннями в господарствах України щорічно виділяються збудники зооантропонозних інфекцій, до яких належить і туберкульоз. Поряд з персистенцією в навколишньому середовищі збудника *M. bovis* виділяють атипіві мікобактерії, які зумовлюють параалергічні реакції на туберкулін (ППД) для ссавців у сільськогосподарських тварин [1].

Проведеними дослідженнями встановлено, що збудники туберкульозу *M. bovis* та *M. avium* мають подібну субмікроскопічну будову і містять клітинну стінку, покриту мікрокапсулою, трьохшарову цитоплазматичну мембрану і добре розвинені мембранні структури (мезосоми), рибосоми, нуклеоїд, вакуолі та осміофільні гранули [2, 3]. Атипіві мікобактерії мають багато спільного з субмікроскопічною організацією збудників туберкульозу, що полягає в різних включеннях, вакуолях, мембранних структурах. Товщина клітинних стінок різних видів мікобактерій також приблизно однакова, за винятком деяких поліморфних форм [4].

Для знищення мікобактерій в навколишньому середовищі застосовують велику кількість дезінфікуючих препаратів, основний перелік яких складається з хлорорганічних засобів.

Біохімічними дослідженнями встановлено, що загибель спорових форм мікроорганізмів від дії гіпохлориту натрію пов'язана з порушенням бар'єру їх проникності, що призводить до виходу з клітин РНК та ДНК, а найважливішу захисну функцію виконують одночасно спорова оболонка і наявність в клітинах дипіколінової кислоти [5].

Літературні дані з електронно-мікроскопічних досліджень мікобактерій після дії хлорорганічних препаратів доволі обмежена, що і дало нам підставу для вибору відповідного наукового напрямку досліджень.

**Мета роботи.** Вивчити ультраструктурні зміни атипівіх мікобактерій після дії хлорорганічного дезінфікуючого препарату.

**Матеріали і методи.** У роботі були використані атипівіх мікобактерії видів *M. kansasii*, *M. goodii*, *M. xenopi*, *M. flavescens* після дії на них хлорорганічного дезінфікуючого препарату «Хлорантоїн» в концентрації 0,5% за експозиції 3 години.

Досліди з отримання інактивованих культур мікобактерій проводили за допомогою суспензійного методу досліджень згідно існуючих методологічних підходів [6].

Підготовку дослідного матеріалу та проведення електронно-мікроскопічного дослідження проводили згідно загальноприйнятої методики:

1) Фіксацію зразків мікобактерій після дії на них дезінфектанту проводили у 2 % розчині глутарового альдегіду на фосфатному буферному розчині (ФБР) при рН 7,4 протягом 2 годин за температури 4 °С. Після закінчення фіксації зразки двічі промивали ФСБ для видалення глутарового альдегіду.

Для збереження клітинної популяції при різних електронно-мікроскопічних маніпуляціях суспензія клітин після етапу фіксації була розміщена у білкову матрицю (10 % сировоточний альбумін).

2) Постфіксацію проводили 1 % розчином чотирьохокисі осмію (OsO<sub>4</sub>), виготовленого на фосфатному буфері. Термін фіксації – 1-2 години за температури 4 °С. Потім матеріал тричі промивали ФСБ для видалення OsO<sub>4</sub>.

3) Дегідратацію зразків здійснювали в еталоні зростаючої концентрації: 30°, 50° – по 15 хвилин, 70° – 30-60 хвилин (+4 °С), далі в 80°, 96° і тричі в абсолютному спирті по 15 хвилин за кімнатної температури.

Для більш ретельного зневоднення зразки тричі поміщали в абсолютний ацетон.

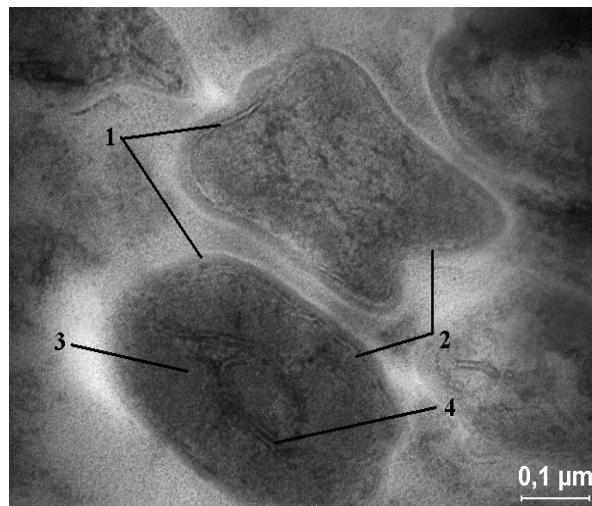
4) Заливка в епоксидні смоли. Зразки просичували за кімнатної температури в суміші: абсолютний ацетон + епоксидні смоли (епон-аралдит) в наступних концентраціях: ацетон : смола – 3 : 1 (60 хвилин); ацетон : смола – 1 : 1 (12 годин); ацетон : смола – 1 : 3 (2-3 години); стандартна суміш смол для заливки – 2-3 години.

Після просичування зразки розкладали в заливні поліетиленові капсули з епон-аралдитовою смолою і залишали на 6-12 годин за кімнатної температури. Далі капсули піддавали полімеризації за 56 °С протягом 48 годин. Після полімеризації дослідний матеріал виймали з термостату, перевіряли якість полімеризації і готували матеріал до дослідження. Для виготовлення зрізів блок зі зразками оформляли у формі піраміди.

Ультратонкі зрізи отримані на ультрамікромомі УМТП-7 збирали на палладійовані сіточки і контрастували насиченим водним розчином уранилацетату і розчином цитрату свинцю.

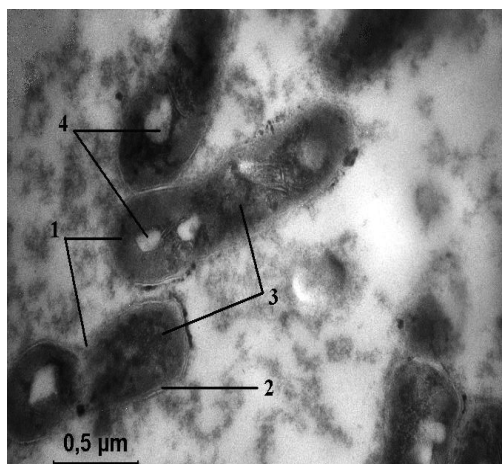
Ультраструктуру мікобактеріальних клітин досліджували за допомогою електронного мікроскопу ПЭМ-125К при прискорюючій напрузі 75 kV, обладнаного системою зйомки і аналізу зображення САИ - 01А (АО "SELMI", м. Суми) за допомогою CCD камери DX-2 і пакету програм фірми «КАРРА», Германія.

**Результати досліджень.** При дії на мікобактеріальну клітину дезінфікуючого препарату «Хлорантоїн» виникають комплексні незворотні зміни структурних елементів мікобактерій, що призводять до загибелі мікроорганізмів (рис. 1, 2, 3, 4).



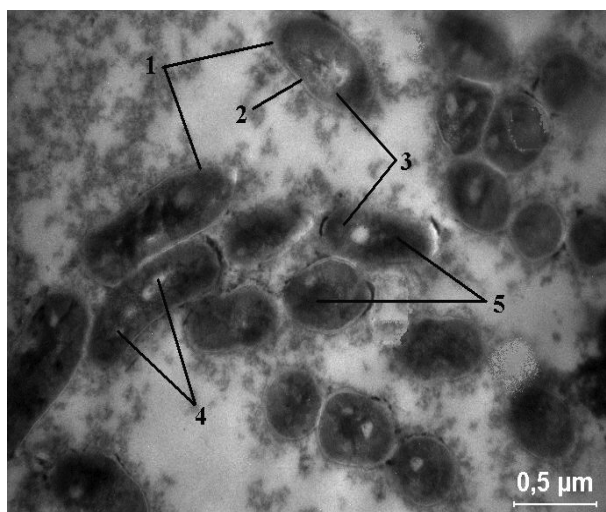
**Рис. 1.** *Mycobacterium kansasii* після дії «Хлорантоїну». 1 – клітинна стінка; 2 – цитоплазматична мембрана; 3 – цитоплазма; 4 – нуклеоїд

При дії на *M. kansasii* препарату «Хлорантоїн» першочергові зміни були виявлені в області нуклеоїду у вигляді осміофільних конгломератів. Цитоплазма представлена гранулярним матеріалом, спостерігали руйнацію мікрокапсули і клітинної стінки. Клітинна стінка частково відходила від протопласта. Цитоплазматична мембрана виявляється незакономірно.

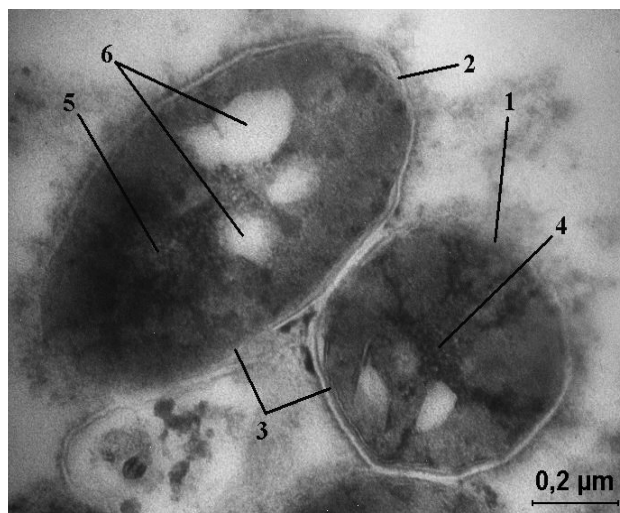


**Рис. 2** *Mycobacterium gordonae* після дії «Хлорантоїну». 1 – руйнація поверхневих структур; 2 – клітинна стінка; 3 – цитоплазма; 4 – вакуолі

При дії на *M. gordonae* препарату «Хлорантоїн» спостерігали сильну руйнацію поверхневих структур клітин. Клітинна стінка проглядається на обмежених ділянках. Цитоплазма складається з гомогенного матеріалу з різними за електронно-оптичною щільністю ділянками. У деяких клітин цитоплазма контактує з зовнішнім середовищем. У середині клітини видно різні за формою вакуолі.



**Рис. 3** *Mycobacterium xenopi* після дії «Хлорантоїну». 1 – лізис мікрокапсули та клітинної стінки; 2 – клітинна стінка; 3 – цитоплазма; 4 – вакуолі; 5 – нуклеоїд



**Рис. 4** *Mycobacterium flavescens* після дії «Хлорантоїну». 1 – порушення цілісності поверхневих структур; 2 – клітинна стінка; 3 – цитоплазматична мембрана; 4 – нуклеоїд; 5 – цитоплазма; 6 – вакуолі

Завдяки тому, що препарат «Хлорантоїн», як хлорорганічний засіб, має високий окислювально-відновний потенціал, він швидко проникає в мікобактеріальну клітину через клітинну стінку і цитоплазматичну мембрану та першочергово діє на високомолекулярні структури мікобактерій, в тому числі і нуклеоїд.

Бактерицидна дія препарату «Хлорантоїн» також зумовлює ураження інших структурних елементів мікобактерій: клітинної стінки, цитоплазматичної мембрани, цитоплазми.

При дії на *M. xenopi* препарату «Хлорантоїн» встановлена руйнація мікрокапсули та клітинної стінки бактерій. У більшості мікобактерій цитоплазма, що представляє собою осміофільний конгломерат з наявними вакуолями, виходить назовні. В області нуклеоїду проглядаються скупчення дрібногранулярної субстанції високої електронної щільності.

При дії на *M. flavescens* препарату «Хлорантоїн» спостерігали розмитість мікрокапсули. Клітинна стінка частково відокремлена від протопласта бактерій, цілісність її порушена. Цитоплазматична мембрана виявляється незакономірно. В центральній частині клітини, в області нуклеоїду, розміщені електронно-щільні конгломерати. Цитоплазма містить вакуолі.

**Висновки.** 1. Електронно-мікроскопічними дослідженнями встановлено, що дезінфікуючий препарат «Хлорантоїн» в концентрації 0,5 % за експозиції 3 години проявляє бактерицидні властивості щодо атипичних мікобактерій *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. flavescens*.

2. Бактерицидний ефект хлорорганічного дезінфектанту зумовлює зміни як внутрішніх (цитоплазма, нуклеоїд) так і зовнішніх (клітинна стінка, цитоплазматична мембрана) структур мікобактерій.

3. Першочергові зміни в мікобактеріальних клітинах, що зумовлені дією «Хлорантоїну», полягають в ураженні високомолекулярних структур бактерій.

**Перспективи подальших досліджень.** Перспективи подальших досліджень полягають у порівняльному вивченні ультраструктурних змін, що виникають у мікобактеріальних клітинах після їх контакту з препаратами різної хімічної природи, а саме альдегідними, кисневими деззасобами, препаратами на основі четвертинних амонієвих сполук.

## Список літератури

1. Воеводина, Ю.А. Микобактериозы крупного рогатого скота в природных условиях Вологодской области [Текст]: автореф. дис... канд. вет. наук: 16.00.03 / Ю.А. Воеводина; [МГУПБ]. – Вологда, 2008. – 29 с. 2. Белоконов, И.И. Электронно-микроскопическое изучение микобактерий туберкулеза [Текст] / И.И. Белоконов [и др.] // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2004. – Вип. 84. – С. 71-75. 3. Кац, Л.Н. Субмикроскопическая организация микобактерий туберкулеза [Текст] / Л.Н. Кац [и др.] // ЖМЭИ. – 1972. – № 4. – С. 33-37. 4. Куликовский, А.В. Электронномикроскопическое исследование атипичных нефотохромогенных микобактерий [Текст] / А.В. Куликовский, В.П. Нелюбин, Г.А. Надточий // Пробл. вет. санитарии. Тр. ВНИИВС, 1972. – Т. 41. – С. 32-35. 5. Куликовский, А.В. Структурные и функциональные основы механизма действия дезинфицирующих средств на бактерии и споры [Текст]: автореф. дис... док. вет. наук: 03.00.07 / А.В. Куликовский; [ВНИИВС]. – Москва, 1979. – 50 с. 6. Методичні рекомендації «Визначення бактерицидних властивостей дезінфікуючих засобів, проведення дезінфекції та контроль її якості при туберкульозі сільськогосподарських тварин [Текст] / А.І. Завгородній [та ін.] // Затв. Держ. комітет. вет. мед. України 20.12.2007 р.

**ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF ATYPICAL MYCOBACTERIA AFTER the ACTION OF «CHLORANTOINE»****Zavgorodny A.I., Paliy A.P.***National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv***Zagrebel'nyy V.O.***State Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv, Ukraine***Repin N.V.***Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS, Kharkiv*

*In the paper materials on the study of ultra-structural changes of atypical mycobacteria after the action on them chlorine containing disinfectant "Chlorantoin" are presented. It has been determined as a result of the conducted researches, that chlorine containing disinfectant stipulates the changes of both internal and external structural elements of mycobacteria, and primary changes in cells are revealed in the affection of high molecular structures.*

УДК 619:616.98:579.873.21:636.2:616-076

**ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ КОРОВ *M. PARATUBERCULOSIS*****Завгородний А.И., Позмогова С.А., Гирка М.А.***Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков*

В последнее десятилетие паратуберкулез (болезнь Johnе) был назван одним из самых серьезных заболеваний в странах с развитой отраслью молочного животноводства [1]. Распространение этой болезни принимает глобальный характер, так по мнению Muskens и др., (2000), Adaska и Anderson (2003), эта инфекция присутствует в каждой стране [2]. Несмотря на проведение профилактических и оздоровительных мероприятий паратуберкулез продолжает наносить животноводству значительный экономический ущерб, который складывается из снижения продуктивности, проблем воспроизводства, преждевременной выбраковки и вынужденного убоя больных животных, а также затрат на проведение диагностических исследований и ограничительных мероприятий в неблагополучных хозяйствах.

Кроме того, существуют проблемы при контроле и диагностике этого заболевания, это связано с очень длительным латентным периодом инфекции и несовершенством существующих диагностических тестов, которыми не всегда удается обнаружить инфицированных животных [6]. Изолированный более 100 лет назад возбудитель паратуберкулеза на сегодняшний день, остается менее изучен, чем возбудители многих других хронических болезней. Не до конца ясна роль диких животных в распространении и циркуляции возбудителя инфекции. Если раньше эта болезнь была больше известна как инфекция, поражающая жвачных животных, то недавно *M. paratuberculosis* (*M. ptb*) также были обнаружены у диких нежвачных животных, таких как барсуков, лисиц, приматов, кроликов и свиней [3]. Один и тот же штамм *M. ptb* способен инфицировать несколько видов животных, способствуя передаче возбудителя между видами [4]. Кроме того, существует тесная связь между характеристиками болезни Johnе у жвачных животных и болезни Крона у человека (хроническое воспалительное заболевание кишечника). Вопрос о причастности *M. ptb* как патогенного начала в возникновении болезни Крона у человека остается еще открытым [5].

Для постановки точного диагноза на паратуберкулез, пока что «золотым стандартом» является культуральный метод и индикация культуры с характерными для вида свойствами. Однако, даже при большом количестве возбудителя в биоматериале, изолировать и адаптировать *M. ptb* к искусственным питательным средам крайне сложно.

Медленный рост и микобактинзависимость являются основными характеристиками и видовыми признаками свежееизолированных из патологического материала культур *M. ptb*. Из научных публикаций известно, что штаммы, выделенные в разных странах от разных видов инфицированных животных по своим фенотипическим и генетическим свойствам, отличаются друг от друга [6, 7], что говорит о существовании нескольких вариантов возбудителя (тип С и тип S).

Данные о циркуляции возбудителя паратуберкулеза на территории Украины и его свойствах, в настоящее время отсутствуют. Полученные знания о культурально-морфологических и биохимических свойствах возбудителя паратуберкулеза позволили бы проводить идентификацию и дифференциацию выделенных культур *M. ptb* от других видов микобактерий.

**Целью работы** было идентифицировать выделенные от коров изоляты микобактерий, изучить их культурально-морфологические и биохимические свойства.

**Материалы и методы.** В работе использовали изолированные от коров медленнорастущие, микобактинзависимые культуры № 5809, № 6651 и референтный штамм *M. Johnei* 738.V.83.

Культурально-морфологические и биохимические свойства изучали по тестам, принятым для оценки туберкулезных бактерий согласно «Методическим рекомендациям по уточнению диагноза на туберкулез у крс благополучных хозяйств и определению видовой принадлежности культур микобактерий» (1987).