

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»**Zavgorodniy A.I., Paliy A.P.***National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv***Zagrebel'niy 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 уоя 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).

При изучении культурально-морфологических свойств посевы культур проводили на яичные среды с содержанием факторов роста: спиртового экстракта бактериальной массы *M. phlei* и на модифицированную среду, а также на картофельную среду Павловского, контролем служила яичная среда для культивирования микобактерий. У культур изучали рост при температурах 25 °C, 37 °C и 45 °C, морфологию колоний: величину, форму, поверхность, R- и S-форму колоний. Тинкториальные свойства исследовали при световой микроскопии мазков, окрашенных по методу Циля-Нильсена.

Для определения биохимических характеристик использовали реакцию гидролиза Твин-80, каталазную активность изучали по методу G. Weyne (1962), амидазную активность по методу A. Taegnet et al. (1964), толерантность к салицилату натрия (1000 мкг/мл среды) и 5 % NaCl по методу D. Kestle et al. (1976), реакцию восстановления теллурита по методу J. Kulbum et al. (1969).

Результаты исследований. Культура № 5809 была выделена спустя 5 месяцев после посева биоматериала (мезентериальные лимфоузлы) на яичную среду с *Mycobacterium J.* При первичном росте культуры № 5809 наблюдали несколько шероховатых, сухих, кремового цвета округлых колоний диаметром 1-2 мм (R-форма). При последующих пересевах на модифицированную яичную среду и среду с экстрактом *M. phlei* интенсивность и скорость роста колоний увеличилась до 12-15 суток. По мере роста на яичных средах колонии образовывали складчатую, ажурную, с неровными краями матовую поверхность. Культура № 5809 и референтный штамм на всех средах росли в R-форме, с поверхности сред колонии легко снимались, имели сухую, крошащуюся консистенцию. На среде Павловского колонии вырастали за 15-20 суток в виде тутовой ягоды, постепенно сливаясь в сплошную многокупольную поверхность, в жидкой части пробирки иногда отмечали скудный рост пленки. Такую же морфологию колоний на этой же среде наблюдали и у референтного штамма.

Первичный видимый рост колоний культуры № 6651 наблюдали через 11 месяцев после посева взвеси мезентериальных лимфоузлов на яичные среды с экстрактом *M. phlei* и модифицированную среду в виде единичных круглых, вначале гладких, но не слизистых, со временем – шероховатых, серо-белого цвета колоний. При дальнейших пересевах скорость роста культуры № 6651 была несколько быстрее, чем у референтного штамма и №5809 и составляла 12-15 суток на среде Павловского, на яичных средах – до 14 суток. По мере роста на картофельной среде колонии культуры № 6651 образовывали бугристую, складчатую поверхность, рост пленки в жидкой части пробирки был значительно интенсивнее, чем у культуры № 5809 и референтного штамма. На яичных средах молодые колонии всегда имели круглую, гладкую форму, со временем сливались, становились сухими (R-форма) и приобретали кремовый оттенок.

Свежевыделенные культуры в первых пассажах росли только при (37-38) °C. При дальнейших многократных пересевах выделенные культуры, а также и референтный штамм приобрели незначительную способность расти при температурах 25, 45 °C. На средах с добавлением 5 % хлористого натрия роста колоний не наблюдали. Салицилат натрия, добавленный в модифицированную среду и среду с экстрактом *M. phlei*, не ингибировал роста культур.

При микроскопии свежевыделенных культур в поле зрения обнаруживали скопления очень мелких кислотоустойчивых палочек, кокков, фуксиновой пыли. В мазках после нескольких пассажей наблюдали прямые, иногда изогнутые с 1-2 зернами на концах, разной длины кислотоустойчивые палочки.

При изучении ферментативных характеристик изучаемых культур было установлено, что все три культуры отличала относительно низкая каталазная активность (от единичных пузырьков до образования пены в 8-10 мм). Культуры №№ 5809 и 6651 восстанавливали теллурит на 21 и 14 сутки соответственно, гидролизовали Твин-80 на 10 сутки, референтный штамм – на 5 сутки. При определении амидазной активности отличительной чертой всех культур была отрицательная (или очень слабая) никотинамидазная реакция, реакции с пиразинамидом и карбамидом были положительными, но с небольшими колебаниями интенсивности окрашивания: наибольшая карбамидазная активность была у культуры № 6651, наименьшая у № 5809, наибольшую пиразинамидазную активность наблюдали у референтного штамма, наименьшую у культуры № 6651.

В большинстве случаев *Mycobacterium* является важным компонентом питательных сред для первичного выделения культуры, но при адаптации некоторых штаммов *M. ptb* эта потребность иногда теряется [8]. Следует отметить, что при многократном пассажировании изолированные нами культуры также частично утратили микобактеринзависимость и приобрели очень слабую способность расти на яичной среде без фактора роста, рост единичных колоний отмечали спустя 2-3 месяца.

Из результатов проведенного исследования установлено, что выделенные культуры и референтный штамм *M. Johnei* 738.V.83. обладают схожими биохимическими характеристиками, вместе с тем, морфология колоний культуры № 6651 несколько отличается от морфологии колоний референтного штамма и культуры № 5809.

Таким образом, результаты сравнительного изучения свойств выделенных культур №№ 5809, 6651 и шт. *M. Johnei* 738.V.83. дают основание отнести изолированные от коров культуры к возбудителю паратуберкулеза.

Принадлежность выделенных культур к виду *M. paratuberculosis* также была подтверждена молекулярно-генетическими исследованиями.

Выводы. 1. На основании результатов сравнительного изучения культурально-морфологических и биохимических свойств, а также результатов молекулярно-генетического исследования, выделенные культуры отнесены к возбудителю паратуберкулеза. 2. Выделенные культуры отличались по морфологическим свойствам. 3. Выделение возбудителя паратуберкулеза доказывает циркуляцию *M. paratuberculosis* в некоторых хозяйствах Украины.

Список литературы

1. Cook. Optimization of methods for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* [Text]// Cook, Kimberly L. and Britt, Jenks S. – 2007. – vol. 69. – P. 154-160.
2. Adaska, J.M. and Anderson, R.J. Seroprevalence of *Johne's*-disease infection in dairy cattle in California, USA [Text]// Preventive Veterinary Medicine. – 2003. – vol. 60. – P. 255-261.
3. Chacon, Ofelia; Bermudez, Luiz E.; and Barletta, Raul G. *Johne's* Disease, Inflammatory Bowel Disease, and *Mycobacterium paratuberculosis* [Text]// Annual Reviews of Microbiology. – 2004. – vol. 58. – P. 329-63.
4. Manning, Elizabeth JB. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: a review of current knowledge [Text] // Journal of Zoo and Wildlife Medicine . - 2001. – vol. – 32(3). – P. 293-304
5. Possible links between Crohn's disease and *paratuberculosis* [Text] Report of the Committee on Animal Health and Animal Welfare, Directorate-General, Health & Consumer Protection, European Commission -2000.
6. *Paratuberculosis*: Organism, Disease, Control [Text] // M.A. Behr, D.M. Collins. – 2010. – 370p.
7. Тырина, В.С. Культуральные и ферментативные свойства производственных штаммов микобактерий паратуберкулеза [Текст]/В.С. Тырина, Ф.Я. Огневская//Контроль и стандартизация средств специфической профилактики и диагностики туберкулеза, бруцеллеза и вирусных болезней животных: Сб. науч. тр. – М., 1988. – С. 35-39.
8. Lambrecht, R.S. and Collins, M.T. *Mycobacterium paratuberculosis*. Factors that influence *mycobactin* dependence [Text] // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease – 1992. – № 15. – P. 239-246.

THE STUDY OF CULTURAL-and-MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF *M. PARATUBERCULOSIS* ISOLATED FROM COWS

Zavgorodnsy A.I., Pozmogova S.A., Girka M.A.

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

The results of a comparative study of cultural-and-morphological and biochemical properties of isolated cultures of *M. paratuberculosis* and reference strain *paratuberculosis* are presented in the paper.

УДК 619:578:616.98:578.828.11

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ, ЦИРКУЛЮЮЧОГО В РІЗНИХ РЕГІОНАХ УКРАЇНИ

Лиманська О.Ю., Герілович А.П., Солодянкін О.С., Болотін В.І., Горбатенко С.К.

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

Симоненко С.І.

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Одним із важливих аспектів дослідження вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) – етіологічного агента лейкозу ВРХ – є вивчення його генетичної варіабельності. Це є однією з основних задач біологічного моніторингу, кінцева мета якого полягає не тільки у вивченні, але й у поясненні зазначеного явища [1]. Вивченню даного питання присвячений ряд робіт. Наприклад, R. Mamoun et al. був проведений порівняльний аналіз секвенованих нуклеотидних послідовностей гена *env* восьми ізолятів вірусу лейкозу ВРХ з різних географічних регіонів, який дозволив встановити, що дивергенція між ними складає 6 % [2]. L. Willems et al. [3], використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), продемонстрували, що *in vivo* швидкість варіації для гена *env* ВЛ ВРХ дорівнює 0,009 %/рік (або дві мутації на 14,464 пар нуклеотидів (п. н.) за 1,5 року) та відповідає заміні однієї амінокислоти при синтезі відповідного білка. Для довгих кінцевих повторів (LTR) L. Willems et al. була визначена швидкість варіації – п'яти мутацій на 9,709 п. н. за 1,5 року. При цьому регуляторні ділянки, розташовані в області LTR, є більш консервативними, ніж ділянки не регуляторні [4]. Порівняння, проведене Hemmatzadeh F., послідовностей гена, що кодує білок gp51, п'яти ізолятів ВЛ ВРХ із різних регіонів Ірану з сімома нуклеотидними послідовностями відповідного гена ВЛ ВРХ, виділеного в різних країнах світу, дозволило зробити висновок про те, що варіабельність гена, що кодує білок gp51, коливається в межах 0,003-5 %. Побудоване філогенетичне дерево показало наявність трьох кластерів, перший з яких об'єднав ізоляти ВЛ ВРХ, виділені на території Франції та Німеччини, другий – на території Ірану, а третій – на території Бельгії, Австралії, Японії, Кореї та Бразилії [5]. McGirr K.M. була вивчена варіабельність генів *tax* та *rex* для восьми ізолятів вірусу лейкозу ВРХ з різних регіонів земної кулі та показано, що варіабельність амінокислотного складу для білків *Tax* та *Rex* складає 9 % та 11 % відповідно [6].

Licursi M. та співавторами, з використанням методів ПЛР, поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) та секвенування, було проведене порівняння 42 зразків провірусу ВЛ ВРХ, отриманих в Японії та Аргентині, з варіантами провірусу ВЛ з різних географічних регіонів (Франції, Бельгії, Італії, Північної Америки, Австралії) та показано, що варіабельність геномного матеріалу вірусу лейкозу ВРХ сягає 3,5 % [7]. Samargos M.F. та співавтори провели порівняльний аналіз послідовності гена *env* трьох штамів ВЛ ВРХ, виділених у трьох різних регіонах Бразилії з сімома відповідними послідовностями штамів ВЛ ВРХ з різних країн світу та встановлено, що бразильські ізоляти мають значно більшу швидкість мутації [8]. Крім того, філогенетичний аналіз повних або часткових послідовностей гена *env* бразильських ізолятів продемонстрував наявність чотирьох або трьох кластерів відповідно [9]. Для вірусу лейкозу ВРХ ідентифіковано на цей час декілька категорій мутацій: 1) мутації, які знижують рівень патогенності вірусу [10-13]; 2) мутації, що не впливають на реплікацію вірусу [14, 15]; 3) мутації, які частково впливають на рівень патогенності та знижують навантаження провірусу на клітину [16, 17]. Але, найважливішими у генетичній варіабельності збудника лейкозу ВРХ (як і в дельтареtroвірусів взагалі) є мутації, які торкаються механізмів реплікації та є невід'ємною частиною життєвого циклу вірусу лейкозу [18]. Саме знання структури та наявності мутацій у геномі ВЛ ВРХ, з одного боку, та просторово-часова взаємодія вірусу з організмом тварини, з іншого боку, є необхідною умовою успішного здійснення контролю за розповсюдженням лейкозу.

Метою даної роботи було вивчення філогенетичних зв'язків ізолятів ВЛ ВРХ, що циркулюють у господарствах різних географічних регіонів України.

Матеріали та методи. Сумарну ДНК із периферичної крові великої рогатої худоби виділяли за допомогою комерційного набору «ДНК-сорб-Б» (Центральний НДІ епідеміології МОЗ РФ, Москва, Росія) або набору для універсальної пробопідготовки Gene Pak™ (ООО «Ізоген», Росія) згідно з протоколами виробників.

Для запобігання згортання крові як антикоагулянт використовували розчин 0,056 М цитрату натрію, 0,166 М глюкози, які додавали до крові тварин із периферичних судин у співвідношенні 1:5.

Для детекції провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби використовували розроблену в ННЦ «ІЕКВМ» та зареєстровану тест-систему «BLV-provirus DNA-тест».

Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в 1,5 %-ому агарозному гелі, забарвленому етидієм бромистим, за напруги електричного поля $U = 75$ В, силі електричного струму $I = 50$ мА. Довжина амплікона дорівнює 241 п. н.

Секвенування фрагментів гена *env* провірусної ДНК ВЛ ВРХ здійснювали на автоматизованому секвенаторі ABI PRISM 311D.

Для побудови філогенетичних дерев використовували програму MEGA, версія 4.1.

Результати досліджень. Для встановлення первинної структури фрагментів геномного матеріалу ВЛ ВРХ шляхом секвенування до Національного ветеринарного дослідного інституту (м. Пулава, Польща) були передані зразки провірусної ДНК, екстрагованої з периферичної крові ВРХ, ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби, що циркулює в господарствах Полтавської, Харківської, Рівненської областей України та АР Крим. Було проведено секвенування фрагментів гена *env* різної довжини, отриманих шляхом ампліфікації з різними наборами праймерів, для десяти ізолятів ВЛ ВРХ.

Для вивчення філогенетичних взаємовідносин між організмами та уточнення часу їхньої дивергенції використовують методи