УДК 619:616.98:879.873.21:636.2-07

ВИВЧЕННЯ КУЛЬТУР МІКОБАКТЕРІЙ ВИДІЛЕНИХ ВІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Котляр О.В.

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

Незважаючи на досягнення ветеринарних фахівців у ліквідації цілого ряду інфекційних захворювань великої рогатої худоби, у тому числі й туберкульозу в Україні,який становить загрозу для сільськогосподарських тварин і здоров'я людей, без сумніву, одним із важливих і першочергових завдань ветеринарної науки та практики є повне оздоровлення та підтримання благополуччя поголів'я ВРХ від туберкульозу, який спричиняє великі економічні збитки народному господарству.

Застосування у ветеринарній практиці алергічного методу діагностики не в усіх випадках забезпечує вірогідну постановку діагнозу на туберкульоз, особливо у хворих тварин, що знаходяться в стані анергії[1]. У тварин інфікованих *M. bovis, M. avium, M. tuberculosis*, а також сенсибілізованих атиповими мікобактеріями відмічають підвищену чутливість до туберкуліну (ППД) для ссавців, що ускладнює визначення епізоотичного статусу поголів'я ВРХ щодо туберкульозу.

Постановка діагнозу на туберкульоз ВРХ багато в чому залежить від якості лабораторних досліджень і швидкості ідентифікації видової належності виділеної культури мікобактерій. Тому постановка первинного діагнозу та з'ясування етіології сенсибілізації макроорганізму є першочергове, а також проведення лабораторних методів дослідження епізоотична ситуація може бути не з'ясована на протязі багатьох років[3, 6].Запропоновані методи ідентифікації в умовах практичних лабораторій не в усіх випадках виконуються у повному обсязі, а діагностика проводиться діагностичним забоєм реагуючих на туберкулін тварин і проведенням патологоанатомічного розтину. При виявленні в органах або лімфатичних вузлах забитих тварин патологічних змін гранульом (туберкул) спричинених збудником туберкульозу, діагноз на туберкульоз вважають встановленим. Також,не з'ясована роль окремих видів атипових мікобактерій в етіології захворювання ВРХ на туберкульоз, а пошук нових та удосконалення існуючих методів ідентифікації в даний час набуває особливої актуальності. Що стосується ролі атипових мікобактерій в неспецифічній реактивності ВРХ до туберкуліну, то в більшості випадків обмежуються тим, що виділені культури мікобактерій відносять до однієї з чотирьох груп по Раньону [2]. Для з'ясування причин алергічних реакцій на туберкулін(ППД) для ссавців у ВРХ необхідно провести комплекс діагностичних досліджень та визначити видову належність ізольованих із біоматеріалу культур мікобактерій. Тому на сьогодні має важливе значення подальше вивчення поширення видів атипових мікобактерій, їх значення в етіології захворювання ВРХ на туберкульоз у різних регіонах країни. [4, 5]. Багато дослідників наводять приклади що до виділення мікобактерій від диких і домашніх тварин,а також птиці, які з екскрементами потрапляють в об'єкти зовнішнього середовища утримання тварин і зумовлюють параалергічні реакції на туберкулін у сільськогосподарських тварин [6, 7].

Мета роботи. Провести дослідження біологічного матеріалу від великої рогатої худоби,позитивно реагуючої на туберкулін(ППД) для ссавців,виділити культури мікобактерій, встановити їх видову належність та вивчити біологічні властивості.

Матеріали та методи. У п'яти господарствах України зони Степу та Лісостепу з невизначеною епізоотичною ситуацією щодо туберкульозу було досліджено алергічним методом8786 голів ВРХ.

Із числа реагуючих тварин (43 голови), які забиті з діагностичною метою, бактеріологічним методом досліджено 43 проби біологічного матеріалу:лімфатичні вузли(заглоткові, підщелепні, бронхіальні, середостінні, портальні, мезентеріальні та пахові) і шматочки паренхіматозних органів (селезінка, печінка, легені) щодо туберкульозу. Дослідження поголів'я алергічним методом проводили згідно «Настанови по діагностиці туберкульозу тварин та птиці» (1994 р.), а ідентифікацію виділених культур мікобактерій за «Методическими рекомендациями по уточнению диагноза на туберкулез у КРС благополучных хозяйств и определению видовой принадлежности культур микобактерий» (1997 р.). Передпосівну обробку біологічного матеріалу проводили за методом Алікаєвої з подальшим висівом зависі дослідного біоматеріалу на поживне середовище для культивування мікобактерій.

Біологічні властивості виділених культур мікобактерій вивчали на клінічно здорових морських свинках вагою 300–350 гр., які до початку досліду не реагували на туберкулін (ППД) для ссавців і (ППД) для птиці. У дослідах було використано 57 голів лабораторних тварин. Завись вивчаємих культур мікобактерій дослідним тваринам водили внутрішньом'язово в дозі 1,0 $см^3$ при концентрації бактеріальної маси в1 мг/мл стерильного фізіологічного розчину. Після ведення морським свинкам зависі вивчаємих культур мікобактерій, їх досліджували симультанною алергічною пробою триразово з інтервалом у 30 діб, із застосуванням туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців і птиці. Облік реакції на мікобактеріальні алергени проводили через 24 і 48 годин після їх введення.

Результати досліджень При дослідженні поголів'я ВРХ у п'яти господарствах та обліку реакцій на туберкульоз було виявлено 58 голів, які позитивно реагували на туберкулін (ППД) для ссавців. Із числа реагуючих тварин було забито з діагностичною метою 43 голови. При розтині та патологоанатомічному дослідженні внутрішніх органів і лімфатичних вузлів характерних для туберкульозу уражень в жодному випадку не було виявлено.

При мікроскопії мазків із виділених культур мікобактерій у полі зору виявляли прямі, злегка вигнуті, довгі, незернисті, товсті, яскраво-червоного кольору палички. У подальшому культури мікобактерій пересівали на 3–5 пробірок з поживним середовищем для культивування мікобактерій та накопичення бактеріальної маси, потім вивчали культурально-біохімічні та біологічні властивості. Ізольовані культури мікобактерій при першому пасажі виростали на 6–30 добу за температури 37 ˚С.

При ідентифікації культур мікобактерій в якості контролю використовували референтні штами культур мікобактерій (*M. bovis, M. avium, M. scrofulaceum, M. gordone*), які знаходяться в музейній колекції лабораторії вивчення туберкульозу ННЦ «ІЕКВМ».

Результати культуральних і біохімічних властивостей ізольованих культур мікобактерій наведені в таблиці 1.

За характером росту та морфології колоній у виділених культур мікобактерій відмічено, що всі вони росли на живильному середовищі для культивування мікобактерій у вигляді вологих, гладких, блискучих колоній з рівними краями, добре суспендувались у фізіологічному розчині. Це дозволило віднести їх до II, III, IV групи за класифікацією Раньона. На підставі вивчення культуральних і біохімічних властивостей виділені культури атипових мікобактерій були віднесені до видів (таблиця 1) *M. gordone– 1;M. avium–intracellulare– 5; M. terrae– 1; M. peregrinum– 1; M. fortuitum– 3; M. smegmatis– 2; M. vaccae– 1;M. phle – 2; M. flavenscens– 2; M. diernhoferi– 1*.

При вивченні сенсибілізуючих і патогенних властивостей атипових мікобактерій видів *M. gordone, M. Avium-intracellulare, M. terrae, M. peregrinum, M. fortuitum, M. smegmatis, M. vaccae, M. phlei, M. flavenscens*, *M. diernhoferi*встановлено, що вони володіють різною біологічною активністю.Так, найбільш виражену здатність зумовлювати алергічні реакції на туберкулін для ссавцівбуло встановлено у культур мікобактерій III групи, за класифікацією Раньона, виду *M. avium-intracellulare*.

Таблиця 1 – Культуральні та біохімічні властивості культур мікобактерій.

№	Вид культури мікобактерій	Кількість культур	Швидкість росту (діб)	Колір колоній	Ріст за температури, °С			Ріст з 5% NaCL	Ріст ізаліцелатомNa	Твін - 80	Редукція телуриту К	Каталазна активність, мм	Амідазна активність	
					25	37	45						НА	ПА
1	*M. gordone*	1	11	Світло-жовтий	+	+	-	-	+	+	+	55	-	-
2	*M. avium intracellulare*	5	17	Світло-сірий	+	+	±	-	+	-	+	20	+	+
3	*M. terrae*	1	20	Світло-сірий	+	+	-	-	+	+	+	70	-	-
4	*M. peregrinum*	1	7	Світло-сірий з жовтуватим відтінком	+	+	-	+	+	+	+	55	-	-
5	*M. fortuitum*	3	4	Білий з кремуватим відтінком	+	+	-	+	+	+	+	90	-	+
6	*M. smegmatis*	2	2	Білий до кремового	+	+	+	+	+	+	+	72	+	+
7	*M. vaccae*	1	5	Жовтий	+	+	-	+	+	+	+	60	+	+
8	*M. phlei*	2	4	Жовто-помаранчеві	+	+	+	+	+	+	+	65	+	+
9	*M. flavenscens*	2	5	Жовтий	+	+	-	+	+	+	-	50	+	+
10	*M. diernhoferi*	1	6	Білий	+	+	-	-	+	-	+	30	-	+
Примітки: «+» – реакція позитивна;«-» – реакція негативна;«±» – реакція не постійна, сумнівна;НА – нікотинамід;ПА – пірозинамід														

Таблиця 2– Результати біологічного дослідження культур атипових мікобактерій в дослідах на морських свинках

№	Вид мікобактерій	Кількість		Реагували на алерген(мм/голів)						Результат розтину
				30 діб		60 діб		90 діб		
		Культур	Тварин	ППД		ППД		ППД		
				ссавців	птиці	ссавців	птиці	ссавців	птиці	
1	*M. gordone*	1	3	10/3	14/3	10/2	13/3	9/1	11/1	-
2	*M. avium intracellulare*	5	15	8/5	12/5	8/5	14/5	6/4	105	-
3	*M. terrae*	1	3	-	-	9/1	9/2	6/1	10/1	-
4	*M. peregrinum*	1	3	-	7/2	-	8/1	-	7/1	-
5	*M. fortuitum*	3	9	-	15/3	12/2	15/3	-	10/1	-
6	*M. smegmatis*	2	6	-	-	-	-	-	-	-
7	*M. vaccae*	1	3	-	10/2	7/1	11/2	-	-	-
8	*M. phlei*	2	6	10/3	12/3	8/2	10/3	-	-	-
9	*M. flavenscen*	2	6	10/3	12/3	8/2	11/3	-	14/2	-
10	*M. diernhoferi s*	1	3	5/2	7/2	5/1	9/1	8/1	10/1	-
11	Контроль	-	6	-	-	-	-	-	-	-
Примітка: «-». – результат негативний;реакції в (мм)– чисельник;реагуючих голів (кількість) – знаменник										

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про те,що культури мікобактерій виду *M. gordone, M. avium-intracellulare, M. peregrinum, M. fortuitum, M. vaccae, M. phlei, M. flavenscens*, *M. Diernhoferi* викликали у морських свинок реакції на туберкулін (ППД) для ссавців і птиці на 30–90 добу дослідження. Інтенсивність алергічних реакцій у дослідних тварин була достовірно виражена на туберкулін (ППД) для птиці на протязі всього досліду. Тварини контрольної групи під час досліду не реагували на внутрішньо шкірне введення алергенів. Усі виділені культури 10 видів (*M. gordone, M. avium-intracellulare, M. terrae, M. peregrinum, M. fortuitum, M. smegmatis, M. vaccae, M. phlei, M. flavenscens*, *M. diernhoferi)* непатогенні для лабораторних тварин. У евтаназованих морських свинок через 90 діб, при патологоанатомічному дослідженні в органах і тканинах, характерних для туберкульозу уражень не було виявлено.

Висновки. 1.З біологічного матеріалу, реагуючої на туберкулін ВРХ виділено культури мікобактерій10 видів(*M. gordone, M. avium-intracellulare, M. terrae, M. peregrinum, M. fortuitum, M. smegmatis, M. vaccea, M. phlei, M. flavenscens*, *M. diernhoferi),* які персистують в гуртах ВРХ та зумовлюють реакції на туберкулін.

2. За результатами проведених досліджень встановлено, що виділені види атипових мікобактерій не патогенні для лабораторних тварин, але обумовлюють підвищену чутливість сповільненого типу на туберкулін для ссавців різної інтенсивності від 30 до 90 діб.

Список літератури

1. Донченко, А.С. Установление парааллергии на туберкулин у крупного рогатого скота в благополучних хазяйствах [Текст] / А.С. Донченко // Ветеринария. – 1987. – № 12. – С. 37–38. **2.** Завгородний, А.И. Атипичные микобактерии у крупного рогатого скота в зоне Лесостепи и Степи Украинской ССР [Текст] : автореф. дис. … канд. вет. наук : 16.00.03 / А.И. Завгородний ; [Бел. НИИЭВ им. С.Н. Вышелесского]. – Минск, 1987. – 23 с. **3.** Мартма, О.В. Парааллергические реакции на туберкулин и их диференциация [Текст] / О.В. Мартма, К.К. Тяхнас // Ветеринария. – 1978. – № 4. – С. 35–38. **4.** Новак, Д.Д. О диагностике туберкулёза и дифференциации туберулиновых реакций [Текст] / Д.Д. Новак // Ветеринария. – 1973. – № 4. – С. 48–49. **5.** Овдиенко, Н.П. Профилактика и ликвидация туберкулёза крупного рогатого скота [Текст] / Н.П. Овдиенко // Ветеринария. – 1986. – № 9. – С. 15–20. **6.** Резервуары атипичных микобактерий в дикой и санантропной фауне Прииртышья [Текст] / В.Г. Ощепков [и др.] // Веткорм. – 2012. – № 4. – С. 24–26. **7.** Хайкин, Б.Я. Туберкулёз пушных зверей [Текст] / Б.Я. Хайкин. – Омск, 1976. – С. 176.

MYCOBACTERIA ISOLATED ATDIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS CATTLE

Kotlyar A.V.

National Scientific Centr "InstituteofExperimentalandClinical VeterinaryMedicine", Kharkiv

From biological material bovine tuberculin reagiruyuchih allocated 10 species of mycobacteria culture (M. gordone, M. avium-intracellulare, M. terrae, M. peregrinum, M. fortuitum, M. smegmatis, M. vaccae, M. phlei, M. flavenscens, M. diernhoferi) that cause the reaction to tuberculin in laboratory animals and do not cause pathological changes typical for tubekruleze.

УДК 619:615.371:616.98:578:619.2

РЕЗУЛЬТАТИ КОМІСІЙНОГО ВИПРОБУВАННЯ ВАКЦИНИ ІНАКТИВОВАНОЇ ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ, ПАРАГРИПУ-3 ТА ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ «РИПАВАК-3»

Кучерявенко В.В., Кучерявенко Р.О.

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

Годовський О.В.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Вірусні пневмоентерити займають провідне місце в інфекційній патології великої рогатої худоби. Головна роль в їх виникненні належить вірусам збудникам інфекційного ринотрахеїту (ІРТ), парагрипу-3 (ПГ-3) та вірусної діареї (ВД) [1, 2, 3].

Вірусні пневмоентерити частіше за все спричиняються асоціацією вище вказаних вірусів і перебігають набагато важче, що часто призводить до загибелі тварин. Тваринницькі господарства таким чином несуть значні економічні збитки [4, 5].

Для профілактики захворювань, які спричинені вірусами ІРТ, ПГ-3 та ВД в ННЦ «ІЕКВМ» розроблена інактивована вакцина «Рипавак-3».

Згідно наказу № 18 від 24.04.2012 р. директора Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів проведені комісійні випробування «Вакцини інактивованої проти інфекційного ринотрахеїту, парагрипу-3 та вірусної діареї великої рогатої худоби «Рипавак-3»» на базі лабораторії вивчення вірусних хвороб рогатої худоби ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» та Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. У проведенні досліджень крім авторів даної статті приймали участь: заступник директора ДНКІБШМ, кандидат ветеринарних наук Бабкін М.В. (голова комісії); науковий співробітник Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ, кандидат ветеринарних наук Напненко О.О.

Матеріали та обладнання. Випробування проводили згідно затвердженої програми за наступними показниками: зовнішній вигляд, колір, маркування; наявність сторонніх домішок, порушенняукупоркита цілісності флаконів; стерильність; нешкідливість; антигенна активність; повнота інактивації та рівень pH. Для дослідження використовували: світловий мікроскоп; pH-метр; термостат з температурою підігріву (37,0–37,0) °С; холодильник побутовий; пробірки з моношаром перещеплюваних клітин нирки вівці (НВ); живильне середовище 199 та Ігла; центрифугу з частотою обертів до 8000 об/хв.; білих мишей (10 голів); мурчаків масою не менше 300 г. (10 голів).

Проведення досліджень та результати.

1. Визначення зовнішнього вигляду, кольору, маркування.

Визначення зовнішнього вигляду, кольору та маркування проводили візуально в пронизуючому світлі.

Результат: вакцина мала вигляд рожевої рідини з пухким осадом білого кольору, який при збовтуванні легко розбивався в однорідну суспензію. Маркування відповідало ДСТУ 4614.

2. Наявність сторонніх домішок, порушення укупорки та цілісності флаконів.

Визначення сторонніх домішок, порушення укупорки та цілісності флаконів проводили візуально в пронизуючому світлі.

Результат: сторонні домішки, порушення укупорки та тріщини флаконів відсутні.

3. Визначення стерильності.

Проводили визначення контамінації бактеріальною та грибною мікрофлорою відповідно до ДСТУ 4483:2005.

Результат*:* Бактеріальна та грибна мікрофлора відсутня.

4. Визначення нешкідливості.

Нешкідливість визначали згідно СОУ 85.20-37-391 на білих мишах.

Результат: вакцина нешкідлива.

5. Визначення антигенної активності.

Антигенну активність вакцини визначали шляхом введення препарату внутрішньом'язово в ділянку стегна п'яти мурчакам у дозі 2,0 см^3. П'ять тварин використовували в якості контролю, для чого вище зазначеним методом вводили середовище 199 (плацебо). Через 18 діб обом групам тварин проводили повторне введення відповідного препарату. Ще через 14 діб були відібрані сироватки крові, котрі були досліджені на наявність специфічних до вірусів ІРТ та ВД антитіл в реакції нейтралізації (РН) відповідно до СОУ 85.20-37-621, а також антитіл до вірусу ПГ-3 в реакції затримки гемаглютинації згідно СОУ 85.20-37-306.

Результат: титр антитіл до ВД становив 1:32, до ІРТ – 1:64, до ПГ-3 – 1:160.

6. Визначення повноти інактивації.

Зразок вакцини у стерильних умовах центрифугували 25 хв за 4000 об./хв. Для відокремлення вірусної маси від ад'юванту, стерильною піпеткою відбирали надосад, який використовували для визначення повноти інактивації. Повнота інактивації оцінювалась за відсутністю розмноження вірусу в чутливій культурі клітин нирки вівці впродовж трьох пасажів, що визначали за його цитопатогенною дією (ЦПД).

Результат: вакцина інактивована.

7. Визначення рівня pH.

Визначення рівня pH виконували за допомогою pH-метра згідно з інструкцією по експлуатації приладу.

Результат: рівень pH становив 7,4.

Висновки. 1.Вакцина інактивована проти інфекційного ринотрахеїту, парагрипу-3 та вірусної діареї великої рогатої худоби «Рипавак-3» відповідає вимогам ТУ У.

2. Розроблена в лабораторії вивчення вірусних хвороб рогатої худоби ННЦ «ІЕКВМ» вакцина інактивована проти інфекційного ринотрахеїту, парагрипу-3 та вірусної діареї великої рогатої худоби «Рипавак-3» антигенно активна, що дозволяє її використання для профілактики вище зазначених захворювань.