

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ВІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ КУЛЬТУРАЛЬНИМ МЕТОДОМ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ

Калашник М. В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: nick.v.kalashnik@gmail.com

У статті наведені результати алергічних, патологоанатомічних і бактеріологічних досліджень біологічного матеріалу від великої рогатої худоби з різних областей України, яка реагувала на туберкулін (ППД) для ссавців. Показано залежність між строками забою реагуючих тварин після туберкулізації та виділенням чистих культур мікобактерій із біологічного матеріалу. Встановлено, що оптимальний термін забою реагуючих тварин і відбір біологічного матеріалу для досліджень становить від 1 до 5 діб. При цьому кількість виділених культур мікобактерій є найбільшою в порівнянні із іншими строками відбору матеріалу для дослідження. Також встановлено вплив різних строків зберігання біологічного матеріалу на показники швидкості та інтенсивності росту виділених культур мікобактерій.

Ключові слова: туберкульоз, велика рогата худоба, *M. bovis*, атипові мікобактерії, біоматеріал, заморозування, культуральне дослідження

Успішний розвиток тваринництва у значній мірі залежить від благополуччя поголів'я гуртів ВРХ по інфекційним захворюванням. Одним з небезпечних антропоозоозів, що завдає значних економічних збитків галузі тваринництва, а також шкоди здоров'ю людини є туберкульоз.

За даними МЕБ захворюваність ВРХ на туберкульоз у різні роки була зареєстрована на всіх континентах [1].

Боротьба з туберкульозом ВРХ у зарубіжних країнах і в Україні будується на проведенні комплексу ветеринарно-санітарних та організаційно-господарських заходів. У системі заходів профілактики та боротьби з туберкульозом тварин важливе значення має своєчасне виявлення джерела збудника інфекції. Для прижиттєвої діагностики цього захворювання в Україні та країнах Європи використовують алергічний метод із застосуванням туберкуліну (ППД) для ссавців [2, 3].

Крім цього контроль благополуччя щодо туберкульозу здійснюють не лише за допомогою внутрішньошкірної туберкулінової проби, але й за результатами післязабійної експертизи туш ВРХ на м'ясопереробних підприємствах.

Завдяки застосуванню різних методів діагностики, заходів профілактики та боротьби з цією інфекцією поголів'я ВРХ було оздоровлено у більшості країн Європи. Але в останні роки в окремих країнах відмічаються спорадичні випадки захворювання серед ВРХ у благополучних, а також рецидиви цієї інфекції в раніше оздоровлених господарствах різних країн ЄС [4].

Що стосується епізоотичної ситуації по туберкульозу ВРХ у господарствах України то за останні 10 років вона значно поліпшилась, а кількість неблагополучних пунктів скоротилась з 60 у 2006 році до одного у 2015 році. Незважаючи на це, при планових алергічних дослідженнях у 180–230 благополучних щодо захворювання на туберкульоз господарствах щороку виявляють тварин, які реагують на внутрішньошкірне введення туберкуліну, у яких при розтині у внутрішніх органах і тканинах не виявляють властивих туберкульозу уражень.

Відомо, що реакції на туберкулін для ссавців у ВРХ можуть обумовлювати збудники туберкульозу *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. paratuberculosis* та деякі види атипових мікобактерій. Псевдоалергічні реакції на туберкулін можуть виникати у хворих ехінокозозом, фасціольозом, актиномікозозом тварин [5].

В останні роки за повідомленнями окремих авторів при первинній постановці діагнозу на туберкульоз фахівці допускають помилки. Можливо, що всі ці випадки пов'язані з різноманітністю прояву інфекції, обумовленої зміною фаз загострення або затухання запального процесу та хвилеподібним проявом епізоотичного туберкульозного процесу. Ще більше помилок допускають при гістологічних дослідженнях, коли підставою для встановлення діагнозу на туберкульоз нерідко є виявлення у передлопаткових лімфатичних вузлах поодиноких гігантських клітин, які виникають при введенні в межах підгруддя та шиї вакцинних препаратів. При патологоанатомічному дослідженні у окремих тварин, забитих з діагностичною метою, у печінці, легенях та брижових лімфатичних вузлах виявляють поодинокі інкапсульовані вузлики паразитарного характеру, які можна сплутати з туберкульозними. При виявленні будь-яких гранулом, гіперплазії, крапкових крововиливів у лімфатичних вузлах деякі дослідники вважають початком розвитку туберкульозного процесу, хоча ці ураження можуть бути зумовлені грибовою інтоксикацією та іншого походження [6].

Разом з цим у інфікованих *M. bovis* тварин розвиток патологічного процесу залежить від біологічних властивостей збудника та імунної резистентності макроорганізму. Крім цього туберкульозна інфекція протягом тривалого часу може мати латентний перебіг від 6 до 12 місяців. Такі тварини з секретами та екскретами можуть виділяти збудника в зовнішнє середовище та контамінувати тваринницькі приміщення, воду і корми [7].

Діагноз на туберкульоз вважають встановленим при виявленні хоча б в одному ураженому органі чи лімфатичному вузлі характерних для туберкульозу уражень або при виділенні збудника *M. bovis*, *M. tuberculosis* [2].

Тому для встановлення діагнозу на туберкульоз у таких тварин необхідно обов'язково проводити бактеріологічне дослідження проб біоматеріалу з метою виділення збудника та визначення епізоотичної ситуації гуртів ВРХ щодо туберкульозу.

Результативність бактеріологічного методу досліджень також залежить від терміну забою реагуючих тварин після обліку алергічних реакцій, якості відбору біологічного матеріалу, терміну його дослідження у свіжому, замороженому або консервованому стані.

Метою нашої роботи було визначення залежності між терміном діагностичного забою тварин після обліку реакцій на туберкулін, ефективністю культурального методу досліджень на туберкульоз, а також різними термінами зберігання біологічного матеріалу у замороженому стані.

Матеріали та методи. Поголів'я ВРХ із трьох господарств досліджували алергічним методом на туберкульоз. Реагуючих на туберкулін тварин забивали, піддавали патологоанатомічним методам і відбирали біологічний матеріал. У першому господарстві забій тварин проводили в день обліку реакції. У другому господарстві тварин забивали через 5 діб, а у третьому господарстві діагностичний забій проводили через 15–20 діб після обліку алергічної реакції.

Проби біологічного матеріалу транспортували в лабораторію вивчення туберкульозу ННЦ «ІЕКВМ». Частину матеріалу було досліджено у свіжому стані. Решту біоматеріалу розділили на три частини, помістили у стерильні чашки Петрі та зберігали в морозильній камері за температури мінус 20 °С протягом 7, 15 та 30 діб. Після витримання зазначених термінів зберігання біологічний матеріал розморожували за кімнатної температури та досліджували культуральним методом на туберкульоз.

Загалом культуральним методом було досліджено 30 проб біологічного матеріалу від реагуючої на туберкулін ВРХ із благополучних щодо туберкульозу господарств різних областей України.

Передпосівну обробку біологічного матеріалу проводили за методом А. П. Алікаєвої.

Висів суспензій біоматеріалу проводили на живильне середовище для культивування мікобактерій. Пробірки з висівами культивували в термостаті за температури 37 °С. Облік росту колоній на поживному середовищі проводили через 5–7 діб протягом 90 діб.

Результати досліджень. При патологоанатомічному дослідженні у внутрішніх органах і тканинах забитих тварин характерних для туберкульозу уражень в жодному випадку виявлено не було.

Культуральне дослідження проб біологічного матеріалу, відібраного від тварин проводили в день забою, на 5 добу та на 15-20 добу після обліку алергічної реакції. Результати щодо вивчення впливу різних строків відбору біоматеріалу від ВРХ на ізоляцію культур мікобактерій наведені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Культуральне дослідження проб біологічного матеріалу від реагуючої на туберкулін ВРХ

№ господарств	Досліджено проб	Висіано пробірок	Бактеріологічне дослідження, через діб	Виділені культури мікобактерій									
				<i>M. bovis</i>					Атипові				
				Первинний ріст		Інтенсивний ріст		Кількість культур	Первинний ріст		Інтенсивний ріст		Кількість культур
				Інтенсивність росту колоній	Ріст колоній, через діб	Інтенсивність росту	Ріст колоній, через діб		Інтенсивність росту колоній	Ріст колоній, через діб	Інтенсивність росту колоній	Ріст колоній, через діб	
1	10	100	Свіжий	+	25	++	35–40	1	+	4–8	#	7–10	5
2	10	100	5	-		-	-	-	+	5–12	#	8–15	3
3	10	100	15–20	-		-	-	-	+	9–13	+++	12–18	1

Із матеріалів наведених у таблиці 1 видно, що при культуральному дослідженні 10 проб біологічного матеріалу від реагуючих на туберкулін тварин із першого господарства було виділено 6 культур мікобактерій. Із них в одній пробі первинний ріст 10 колоній на поверхні живильного середовища відмічали на 25 добу, а на 35–40 кількість колоній збільшилась до 28. З п'яти інших проб біоматеріалу на 4–8 добу встановлено ріст від 5 до 10 колоній мікобактерій, а на 7–10 добу культивування інтенсивність росту значно збільшилась від 50 до суцільного росту по всій поверхні живильного середовища.

При культуральному дослідженні 10 проб біоматеріалу із другого господарства від тварин забитих через 5 діб після обліку алергічної реакції було виділено 3 культури швидкоростучих атипових мікобактерій. Первинний ріст атипових мікобактерій встановлено на 5–12 добу після висіву суспензій на поживне середовище. На 8–15 добу інтенсивність росту колоній значно збільшилась, ріст культур відмічали по всій поверхні живильного середовища.

Проби біоматеріалу із третього господарства досліджували через 15–20 діб після обліку алергічних реакцій. Із 10 дослідних проб ріст колоній мікобактерій відмічали в одній пробі на 9–13 добу. Інтенсивність росту колоній збільшилась на 12–18 добу відповідно.

Якщо оцінювати результати проведених бактеріологічних досліджень в цілому, то 1 культура *M. bovis* була виділена із свіжовідібраного матеріалу з одного господарства.

Щодо тварин, у яких сенсibiliзація була зумовлена атипovими мікобактеріями, то зі свіжого матеріалу виділено найбільшу кількість атипovих мікобактерій (5 культур), від забитих тварин через 5 діб – 3 культури. При збільшенні терміну забою тварин до 15–20 діб зменшується і кількість виділених культур атипovих мікобактерій (1 культура).

На підставі проведених бактеріоскопічних, культуральних, біологічних досліджень та вивчення біохімічних властивостей у ізольованих культур мікобактерій одну культуру було віднесено до збудника туберкульозу *M. Bovis*, а дев'ять інших культур до швидкоростучих мікобактерій IV групи за класифікацією Раньона видів: *M. fortuitum*, *M. flavescens*, *M. vaccae*, *M. phlei*.

Крім цього нами було проведено культуральне дослідження свіжого та одноразово замороженого біологічного матеріалу від реагуючої на туберкулін ВРХ. Для дослідження використовували біоматеріал із першого господарства, де було виділено найбільшу кількість культур мікобактерій у попередньому досліді (таблиця 1). Результати щодо вивчення строків зберігання біологічного матеріалу від ВРХ у замороженому стані представлені в таблиці 2.

Таблиця 2 – Вплив строків зберігання біологічного матеріалу від ВРХ на ізоляцію мікобактерій

Досліджено проб	Висіяно пробірок	Ідентифіковані культури					
		<i>M. bovis</i>		Кількість культур	Атипovі		Кількість культур
		Первинний ріст, діб	Інтенсивний ріст, діб		Первинний ріст, діб	Інтенсивний ріст, діб	
7 діб зберігання							
10	100	26	37-44	1	4-9	7-11	5
15 діб зберігання							
10	100	30	49-56	1	6-10	12-15	4
30 діб зберігання							
10	100	-	-	-	13-15	17-20	1

При обробці біологічного матеріалу від ВРХ, що зберігався протягом 7 діб, ріст культури *M. bovis* спостерігали на 26 добу після висіву, а інтенсивний ріст культури – на 37–44 добу. Первинний ріст культур атипovих мікобактерій відмічали на 4–9 добу, а інтенсивний ріст – на 7–11 добу. Виділено 5 культур атипovих мікобактерій та 1 культуру збудника туберкульозу ВРХ.

Із біоматеріалу, що зберігався протягом 15 діб, також було виділено 1 культуру *M. bovis* та 4 культури атипovих мікобактерій.

При дослідженні біоматеріалу, що зберігався в замороженому стані протягом 30 діб було виділено тільки 1 культуру атипovих мікобактерій.

Висновки. Для встановлення джерел збудника та з'ясування природи реакцій на туберкулін діагностичний забій реагуючих на туберкулін тварин необхідно проводити в день обліку алергічної реакції або протягом перших п'яти діб після отримання результатів алергічного дослідження.

Забій тварин у більш віддалені строки (до 20 діб) знижує діагностичну цінність культурального методу діагностики на туберкульоз, зменшується кількість виділених культур мікобактерій.

Термін зберігання біологічного матеріалу в замороженому стані для проведення бактеріологічного дослідження на туберкульоз не повинен перевищувати 7 діб.

Список літератури

- OIE Oie world animal health information system / OIE. — 2015.
- Інструкція з профілактики та боротьби з туберкульозом тварин / Київ : 2009.
- OIE Bovine tuberculosis / OIE. — 2009.
- Eurosurveillance editorial team The european union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013 / Eurosurveillance editorial team. — European Food Safety Authority, 2015. — 162 c.
- Найманов А. Х. Патологоанатомические исследования и дифференциальная диагностика туберкулеза крупного рогатого скота / А. Х. Найманов, О. В. Якушева, Н. Г. Толстенко. — Москва : 2008.

6. Найманов А. Х. Особенности патологоанатомической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / А. Х. Найманов, Н. Г. Толстенко, Е. П. Вагнели [et al.] // Ветеринария. — 2015. — No. 11. — С. 13–17.
7. Найманов А. Х. Туберкулез крупного рогатого скота при естественном и искусственном заражении / А. Х. Найманов, В. И. Косенко, О. В. Якушева // Труды ВИБВ. — 1991. — No. 69. — С. 144–150.

THE STUDY OF BIOLOGICAL MATERIAL FROM CATTLE BY CULTURE METHOD ON TUBERCULOSIS

Kalashnyk M. V.

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

The aim. to determine the dependence between terms of diagnostic slaughtering of animals after accounting reactions to tuberculin, efficiency of culture method of studies and storage period of frozen material.

Materials and methods. Cattle were investigated by allergic test on tuberculosis. Animals with the reaction on tuberculin were slaughtered on the first farm in the day of accounting, on second farm – after 5 days, on third farm – after 15–20 days. Anatomopathological study and collection of biomaterial were performed. Part of samples were frozen at minus 20 °C for 7, 15, 30 days and investigated by cultural method on tuberculosis. Preliminary treatment of biological material was performed by A.P. Alikaeva method. Suspensions were inoculated on a nutrient medium for cultivation of mycobacteria. Colony growth rate was performed during 90 days.

The results of investigations. The changes specific for tuberculosis were not found in the internal organs and lymph nodes at post mortem examination. Six mycobacterial cultures were isolated during the cultural study of 10 samples of biological material from the first farm. Primary growth of one culture noted on the 25th day, intensive growth – on 35th–40th day. Other five cultures were grew on 4th–8th day, intensive growth observed on 7th–10th day.

Three mycobacterial cultures were isolated in the study of 10 samples of biological material from animals from the second farm. Primary growth of colonies was observed to 5th–12th day and intensive growth – on 8th–15th day of cultivation.

The growth of colonies was observed in one sample on 9th–13th day and intensive growth – on 12th–18th day from 10 examined samples from third farm.

*Isolated cultures of mycobacteria were classified to the species *M. bovis* (one culture), 9 cultures – *M. fortuitum*, *M. flavescens*, *M. vaccae*, *M. phlei*.*

*Five cultures of atypical mycobacteria and one culture of *M. bovis* were isolated from the biological material that has been stored during 7 days. One culture of *M. bovis* and 4 cultures atypical mycobacteria were isolated from biological material that have been stored during 15 days and only 1 culture – from biological material that was stored 30 days in a frozen condition.*

Conclusions. The diagnostic slaughtering of reacted on tuberculin cattle is necessary to conduct during the first five days after the accounting of allergic reactions. Storage of biological material in a frozen condition should not exceed a period of 7 days.

Keywords: *tuberculosis, cattle, *M. bovis*, atypical mycobacteria, biomaterial, cultural study*