УДК619:616.98-078:579.873.21:57.083.13:636.91

ДОСЛІДЖЕННЯ ПАТОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ВІД ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН НА ТУБЕРКУЛЬОЗ

М. В. Калашник, аспірант, Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

У статті наведені результати культуральних досліджень патологічного матеріалу від морських свинок на туберкульоз. Встановлено залежність і вплив процесу заморожування та різних строків зберігання патологічного матеріалу на показники росту та висіваємості культур мікобактерій M. bovis шт. Vallee.

Ключові слова: *туберкульоз, M. bovis, культуральне дослідження.*

Постановка проблеми у загальному вигляді.Збільшення виробництва та підвищення якості продукції тваринництва значною мірою залежить від благополуччя гуртів великої рогатої худоби щодо інфекційних хвороб,в тому числі і при туберкульозі. Захворювання людей і тварин на туберкульоз в різні роки відмічали на всіх континентах земної кулі. Серед сільськогосподарських тварин туберкульозну інфекцію найчастіше відмічають серед ВРХ. На сьогоднішній день туберкульоз є актуальною медико-соціальною, ветеринарною та екологічною проблемою у всьому світі [1, 2].Одним із значних факторів, який позитивно впливає на розвиток галузі тваринництва, є профілактика та оздоровлення гуртів ВРХ від цього захворювання.

Зв'язок з важливими науковими і практичними завданнями. Дослідження проводились за завданням: «Вивчити екогеографічні, молекулярно-генетичні та еволюційні особливості мікобактерій різних видів», номер державної реєстрації: 0111U000829.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Щодо поширення туберкульозної інфекціїсеред ВРХ у світі, то вона має нерівномірне розповсюдження. Так за даними МЕБ на європейському континенті кількість неблагополучних пунктів складала 70,98 %, а хворих тварин — 68,7 %, в країнах Азії — 1,21 % і 10,6 %, на Американському континенті — 9,15 % і 8,64 %, в Австралії та Японії 2,41% і 3,22 % відповідно. На початок 2000 року благополучними по туберкульозу ВРХ були 35 країн світу. З цього числа 19 країн були благополучними по туберкульозу протягом 5 років [3].

Щодо розповсюдження туберкульозної інфекції серед ВРХ в господарствах України, то за останні 7 років кількість неблагополучних пунктів по цьому захворюванню значно зменшилась від 60 в 2007 році до 1 пункта в 2015 році. Не дивлячись на досягнуті успіхи в боротьбі з туберкульозом в окремих областях серед поголів'я ВРХ відмічаються випадки виникнення цього захворювання як в благополучних так і в раніше оздоровлених господарствах.

В системі заходів профілактики та боротьби з туберкульозом велике значення має своєчасна та ефективна його діагностика. Для прижиттєвої діагностики туберкульозу застосовують внутрішньошкірну туберкулінову пробу, за результатами якої визначають наявність або відсутність інфікованих тварин у господарстві [4]. При цьому необхідно також відмітити, що реакції на туберкулін можуть зумовлювати не тільки збудники туберкульозу, але й деякі види атипових мікобактерій. Отже в організмі тварин можуть одночасно циркулювати патогенні та персистувати непатогенні атипові мікобактерії.

Разом з цим розвиток туберкульозного процесу в організмі тварин залежить від його резистентності та вірулентності збудника. Крім того туберкульозна інфекція може протікатиі у латентній формі [5].

Для остаточного визначення епізоотичної ситуації вгуртах необхідно проводити додаткові дослідження із застосуванням патологоанатомічного та бактеріологічного методів досліджень. Діагноз на туберкульоз вважають встановленим при виявленні в органах і тканинах характерних для туберкульозу змін або виділенні збудника *M. bovis, M. Tuberculosis* культуральним методом [4].

Для постановки заключного діагнозу на туберкульоз використовують бактеріологічний метод дослідження. Виділити збудника туберкульозу з біоматеріалу від забитих з діагностичною метою тварин культуральним методом не завжди є можливим. Це залежить від якості відібраного для дослідження біоматеріалу, терміну його дослідження, кількості життєздатних мікобактеріальних клітин у ньому, способу передпосівної обробки та елективності поживного середовища, що використовується для індикації мікобактерій [6].

В практиці бактеріологічних лабораторій для передпосівної обробки використовують метод Гона–Левенштейна–Суміоші, метод А.П. Алікаєвої, метод флотації, а також розчин хлоргесидінбіглюконіума, препарат «Лесептик», лаурілсульфат натрію в композиції з розчином лугу. Не дивлячись на велику кількість запропонованих способів та використання різних діючих речовин та детергентів вони мають свої недоліки. Хімічні сполуки при застосуванні можуть частково пригнічувати ріст культур мікобактерій при культивуванні на селективних поживних середовищах

[6-9].

Разом з цим на мікобактеріальні клітини діють ферментативно-біологічні фактори, які містяться в патологічному матеріалі та згубно впливають на життєздатність мікобактерій [10].

Достовірність бактеріологічної діагностики при дослідженні на туберкульоз залежить від впливу різних хімічних речовин та фізичних факторів на життєздатність мікобактерій, тому результат та ефективність культурального дослідження на туберкульоз залежить в першу чергу від стану біологічного матеріалу, методів консервування, умов та терміну його зберігання.

Мікобактерії туберкульозу в дистильованій воді за температури 37^{o} С втрачають життєздатність через 3 тижні. У неконсервованій мокроті за температури мінус 24^{o} С мікобактерії залишаються живими 1-4 місяці, а при додаванні гліцерину в якості консерванту гинуть вже через 10 діб. Температурні коливання навколишнього середовища значно знижують висіваємість та інтенсивність росту та збільшують строк появи культур мікобактерій туберкульозуна живильному середовищі.Ізоляція культур мікобактерій туберкульозу із біологічного матеріалу від тварин різко знижується за температури мінус 18^{o} С протягом 3 місяців зі 100 % до 37,5 % [11]. При зберіганні протягом 30 діб у 30 % розчині гліцерину висіваємість мікобактерій знижується у 2 і більше разів [12].

Мета дослідження. З'явилась необхідність вивчити культурально-морфологічні, тинкторіальні та ростові властивості мікобактерій в залежності від термінів зберігання патологічного матеріалу при культуральному дослідженні на туберкульоз. Мета роботи полягала у вивченні строків висіваємості мікобактерій із патологічного матеріалу після різних термінів його зберігання.

Матеріали і методи досліджень. Для постановки біологічної проби були відібрані клінічно здорові морські свинки вагою 250,0-300,0 грамів. Перед зараженням тварин досліджували алергічним методом на туберкульоз із застосуванням «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців в стандартному розчині», серія № 29, термін придатності до 24.06.2016 року. Облік алергічної реакції на мікобактеріальний алерген проводили через 24 години після введення.

Дослідним тваринам вводили завись культури *M. bovis*(шт. *Vallee*) у дозі 1,0 см^{3} підшкірно в область правого стегна з медіальної сторони.Тварин, що загинули під час досліду та евтазованих через 90 діб, піддавали патологоанатомічному дослідженню, відбирали зразки патологічного матеріалу: лімфатичні вузли, шматочки легень, печінки, селезінки від 6 голів морських свинок.

Із внутрішніх органів робили мазки-відбитки, які фарбували за методом Ціля-Нільсена та проводили мікроскопію під імерсійною системою світлового мікроскопа «UNICO».

Відібраний від лабораторних тварин патологічний матеріал досліджували в свіжому стані. Решту патматеріалупоміщали у стерильні чашки Петрі, заморожували в морозильній камері та зберігали протягом 7, 15, 30 діб за температури мінус 20^{o} С. Після закінчення встановлених термінів зберігання патологічний матеріал розморожували за кімнатної температури 20^{o} С та проводили дослідження культуральним методом на туберкульоз.

Передпосівну обробку свіжого та замороженого протягом 7, 15, 30 діб патологічного матеріалу проводили за методом А.П. Алікаєвої з використанням 5 % сірчаної кислоти за експозиції 20 хвилин.

Після проведення передпосівної обробки суспензію патологічного матеріалу висівали на поживне середовище для культивування мікобактерій. Пробірки з висівами розташовували у термостаті за температури 37^{o} С на 2-3 доби у скошеному положенні. Після цього ватно-марлеві пробки парафінували, розміщували у бактеріологічні штативи та культивували в термостаті за температури 37^{o} С.

Облік росту культур мікобактерій проводили протягом 90 діб.

Результати власних досліджень. При проведенні патологоанатомічного дослідження у тварин відмічали виснаження, збільшення пахових лімфатичних вузлів, некротичні осередки, вузлики які оточені щільною капсулою. Печінка та селезінка були збільшені в 1,5-2 рази, дряблої консистенції з наявністю туберкульозних уражень розміром від макового до просяного зерна.

Бактеріоскопічним методом у мазках-відбитках були виявлені кислотостійкі палички, які мали світло-червоний колір. У мікроскопічних препаратах мікобактеріальні клітини мали форму тонких, прямих та дещо зігнутих паличок із заокругленими кінцями.

Після передпосівної обробки патологічного матеріалу проводили культуральне дослідження кожного ураженого органу окремо. Результати культурального дослідження патологічного матеріалу від морських свинок наведена в таблиці.

Таблиця

Дослідження свіжого патологічного матеріалу від морських свинок (n=6)

Досліджений матеріал	Кількість висіяних пробірок	Ріст колоній у пробірках	Швидкість росту мікобактерій (діб)	Кількість колоній мікобактерій	Інтенсивність росту колоній
Свіжий патологічний матеріал					
Печінка	60	60	18	<3000	#
Селезінка	60	60	19	2356	+++
Лімфатичні вузли	60	56	21	1027	++
Легені	60	55	21	1005	++
7 діб зберігання					
Печінка	60	48	18	1440	+++
Селезінка	60	42	21	1080	++
Лімфатичні вузли	60	24	28	720	++
Легені	60	25	29	712	++
15 діб зберігання					
Печінка	60	49	20-25	480	++
Селезінка	60	45	21-26	300	++
Лімфатичні вузли	60	42	25-30	220	+
Легені	60	14	35-38	104	+
30 діб зберігання					
Печінка	60	30	45-48	348	++
Селезінка	60	30	43-52	252	++
Лімфатичні вузли	60	24	46-50	150	+
Легені	60	12	52-60	78	+

Примітки: «+» - від 1 до 10 колоній мікобактерій;
«++» - від 10 до 20;
«+++» - від 20 до 50;
«#» - суцільний ріст колоній мікобактерій на поживному середовищі.

За результатами таблиці видно, що при висіві суспензій із свіжого патологічного матеріалу від морських свинок заражених культурою *M. bovis*ріст культур спостерігали на 18-21 добу. При цьому первинний ріст колоній мікобактерій спостерігали на 18 добу із проб печінки, на 19 добу – з селезінки, на 21 добу – з лімфатичних вузлів та легень у вигляді дрібних, сухих та шорстких колоній білого та світло-сірого кольору (R-форма), які не утворювали пігмент при культивуванні на щільному яєчному середовищі для культивування мікобактерій. Загальна кількість колоній в 60 висіяних пробірках із поживним середовищем складала більш ніж 3000 за інтенсивності зросту «#» із проб печінки, 2356 колоній, «+++» – із проб селезінки, 1027 і 1005 колоній мікобактерій, «++» – із проб лімфатичних вузлів та легень.

При висіві патологічного матеріалу від лабораторних тварин, що зберігався 7 діб в морозильній камері, первинний ріст культури (шт. *Vallee*) був зафіксований на 18 добу із печінки, на 21 добу з селезінки, на 28 добу з лімфатичних вузлів, на 29 добу з легень. Інтенсивність росту колоній складала: «+++» – із проб печінки, «++» – із проб селезінки, лімфатичних вузлів, легень. Загальна кількість колоній мікобактерій в 60 пробірках становила: 1440, 1080, 720, 712 відповідно.

При дослідженні патологічного матеріалу розмороженого через 15 діб було встановлено, що колонії мікобактерій виростали не у всіх пробірках. Так із зразків печінки від лабораторних тварин з 60 висіяних пробірок ріст мікобактеріальних колоній встановлений у 49 пробірках. При цьому первинний ріст було встановлено на 20-25 добу, а інтенсивність була на рівні «++» при загальній кількості 480 колоній. Із досліджених проб селезінки тварин ріст колоній спостерігали у 45 пробірках на 21-26 добу. Інтенсивність була на рівні «++», а загальна кількість колоній становила 300 одиниць. Із загальної кількості пробірок із висівами проб лімфатичних вузлів ріст колоній було зафіксовано у 42 пробірках із 60, інтенсивність росту – на рівні «+» при 220 колоніях. На 15 добу із легеневої тканини колонії виростали на 35-38 добу в 14 пробірках, при цьому інтенсивність росту 104 колоній становила «+».

При висівах зависі патологічного матеріалу від лабораторних тварин, що зберігався у морозильній камері протягом 30 діб, появу росту відмічали на 45-48 добу (печінка), на 43-52 добу (селезінка), на 46-50 добу (лімфатичні вузли) та на 52-60 добу (легені). Кількість колоній мікобактерій складала від 78 з проб легень до 348 з проб печінки, а показник інтенсивності росту культур був на рівні «+» та «++».

Висновки. 1. Результати проведених досліджень свідчать про те, що строки виділеннязбудника туберкульозу *M. bovis*із патологічного матеріалу та інтенсивність росту на поживномусередовищі залежать від терміну дослідження. Встановлено, що найкращі показники первинного росту колонійвідмічали при культуральному дослідженні свіжого патологічного матеріалу печінки на 18 добу, селезінки – на 19 добу, легень та лімфатичних вузлів – на 21 добу культивування.

2. Зберігання проб патологічного матеріалу в замороженому стані протягом15-30 дібвпливає

на життєздатність мікобактерій та призводить до зниження швидкості та інтенсивностірросту культур на поживному середовищі.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати культурального дослідження біологічного матеріалувід лабораторних тварин свідчать про необхідність вивчення впливу процесу заморожування та зберігання біологічного матеріалу від великої рогатої худоби, реагуючої на туберкулін (ППД) для ссавців, на висіюваність мікобактерій. Дослідження в цьому напрямку є актуальними та представляють практичний інтерес для профільних спеціалістів ветеринарної медицини.

Список використаної літератури:

1. OIE World Animal Health Information System// Weekly Animal Disease sevice global report [Електронний ресурс]. URL: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review/viewsummary?fupser=&dothis
2. WHO Global tuberculosis report 2015 / WHO. — World Health Organization, 2015.
3. Палій А.П. Епізоотологічний моніторинг туберкульозу великої рогатої худоби та науково-експериментальне обґрунтування розробки і застосування : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня док. вет. наук: спец. 16.00.03 "Ветеринарна мікробіол., вірусол., епізоотол., інф. хвороби та імунол." / А.П. Палій. – Харків, 2013. – 40 с.
4. Інструкція з профілактики та боротьби з туберкульозом тварин (затверджена Державним комітетом ветеринарної медицини України, наказ № 316 від 03.09.2009 р.).
5. Туберкулез сельскохозяйственных животных / [А.М. Колычев, Ю.Я. Кассич, О.В. Мартма и др.]; под ред. В.П. Шишков, В.П. Урбан. – Москва.: Агропромиздат, 1991. – 255 с.
6. Настанова по діагностиці туберкульозу тварин та птиці / Київ, 1994.– 39с.
7. Голышевская В.И. Обработка мокроты раствором хлоргексидинбиглюконикума отечественного производства / В.И. Голышевская, Н.М. Макаревич // Проблемы туберкулеза. – 1990. – № 3. – С. 41-43.
8. Способ выявления микобактерий туберкулеза [Електронний ресурс]. URL: http://www.findpatent.ru/patent/219/2190220.html (дата звернення: 28.01.2016).
9. Способ предпосевной обработки проб, снятых с объектов внешней среды, на выделение микобактерий [Електронний ресурс]. URL: http://www.findpatent.ru/patent/240/2402781.html (дата звернення: 28.01.2016).
10. Балан В.И. Способ консервации патологического материала для культурального выявления микобактерий туберкулеза / В.И. Балан // Проблемы туберкулеза. – 1988. – № 7. – С. 40-41.
11. Боганец Н.С. Бактериологическая диагностика туберкулеза животных и ее усовершенствование: автореф. дис. на соиск. уч. степ. док. вет. наук: спец. 16.00.03 "Ветеринарная микробиол., вирусол., эпизоотол., микол. с микотокс. иммунология" / Н.С. Боганец. – Омск, 2006. – 30 с.
12. Белобородова А.А. Повышение эффективности лабораторной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота : автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд. вет. наук : спец. 16.00.03 "Ветеринарная микробиол., вірусол., эпизоотол., микол. с микотокс. иммунология" / А. А. Белобородова. – Новосибирск, 2008. – 20 с.

Калашник Н. В. Исследование патологического материала от лабораторных животных на туберкулез.

В статье приведены результаты культуральных исследований патологического материала от морских свинок на туберкулез. Установлена зависимость и влияние процесса замораживания, а также разных сроков хранения патологического материала на показатели роста и высеваемости культур микобактерий M. bovis шт. Vallee.

Ключевые слова: *туберкулез, M. bovis, культуральное исследование.*

Kalashnyk M. V. Study the pathological material on tuberculosis inl aboratory animals.

The article presents the results of cultural test of pathological material from guinea pigs on tuberculosis. The dependence and effect were set between the freezing process of the material, different storage periods, growth and inoculation of Mycobacteriumbovis strain Vallee.

The depletion and increase of the inguinal lymph nodes, necrotic focuses, nodules, with surrounded capsule were found during the post mortem examination of animals. Liver and spleen were enlarged in 1,5-2 times, had flabby consistency with the presence of tuberculous lesions in size from poppy seed to a millet seed. Light red acid-fast bacilli were identified in smears during bacterioscopy method. In smears mycobacterial bacilli had thin, straight and curve form of cells with rounded edges. Cultural studies of each affected organ were performed separately after pathological material treatment.

Keywords: *tuberculosis, M. bovis, cultural study.*

Рецензент: д.вет.н., професор Кассіч В. Ю.

Дата надходження до редакції: 17.01.2016 р.