

2. Качок необхідно ревакцинувати асоційованою вакциною проти хвороби Ньюкасла і пастерельозу через 5 місяців після первинного щеплення цією ж вакциною незалежно від 100% імунного захисту проти ХН.

#### Список літератури

1. Безрукавая И.Ю., Завалий М. Н., Соляник Л.Б. Парамиксовирусная инфекция уток // ж. «Ветеринария» - М. - 1997, - №5. с.20. 2. Alexander D.Y. Newcastle disease and other paramyxoviridae infections // Rex. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. - 2000. - Vol.19, №2. - P. 443 - 456. 3. Е.В.Усачев, М.Ю. Шелканов, И.Т.Федякина и др. Молекулярно-вирусологический мониторинг вируса болезни Ньюкасла (Paramyxoviridae Avulavirus) в популяциях диких птиц дельты Волги (данные 2001 г.) // Вопросы вирусологии. - 2006. - Т. 51, № 5. - с. 32-38. 4. Олександр Вержиховський, Юрій Колос, Валентина Титаренко, Віктор Стець. Епізоотичний стан птахівництва в Україні // Ветеринарна медицина України. - 2007. - № 6. - С. 8 - 11. 5. Б.Т.Стегній, Д.В.Музика. Науковий супровід актуальних проблем ветеринарного забезпечення птахівництва // Ветеринарна медицина України. - К. - 2008. - №10. - с.11 - 13. 6. Сікачина В.І. і інші. Щеплення бройлерів проти хвороби Ньюкасла вакцинами фірми «Intervet» (Нідерланди). // «Птахівництво». - Мат.ІІ міжн. наук.-практ. конф. по птахівництву (17-21 вересня 2007 р., м. Судак). - В.60. - Харків. - 2007. - с.15-20. 7. Сікачина В.І. і інші, Розробка асоційованої емульсинвакцини проти Ньюкаслської хвороби та пастерельозу курей. // Темат.наук.збірник. --Харків. - 2004. - с.625-627. 8. Цімох П.П. і інші. Розробка і вдосконалення засобів специфічної профілактики пастерельозу птахів // Ветеринарна медицина України. - К. - 1987. № 8. - с.13. 9. Сікачина В.І., Плис В.М., Короленко Л.С. Щеплення гусей і качок емульсинвакциною проти хвороби Ньюкасла курей // «Ветеринарна медицина». - наук.збірник. - Харків. 2008. - с.441 - 443. 10. Б.Т.Стегній, Д.В.Музика, С.С.Драгуть, О.М.Рула Забезпечення епізоотичного благополуччя птахівництва України. // Вісник аграрної науки. - К. - 2008. - с. 28 - 33.

### VACCINATION OF DUCKS BY ASSOCIATED VACCINE AGAINST NEWCASTLE DISEASE AND PASTEURELLOSIS

Sikachna V.I.

Dnipropetrovsk Experimental station of the National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical veterinary medicine»

*Experiments were conducted on 20 ducks, imported from safe concerning significant infections poultry farms from the steppe of Ukraine. For experiments there were used serial biofactory vaccines: against Newcastle disease - «Vaccine inactivated against poultry Newcastle disease» (emulsive vaccine against Newcastle disease of chickens); against Pasteurellosis - inactivated bacterin (emulsive vaccine against Pasteurellosis of all poultry species). Both preparations are produced by Dnipropetrovsk State Biofactory. Associated vaccine against Newcastle disease and Pasteurellosis was antigen-active for five months after vaccination.*

УДК 619:616.98:579.873.21:577.21

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ ШТАМУ *Mycobacterium elephantis*, ІЗОЛЬОВАНОГО ВІД КОРОВИ, РЕАГУЮЧОЇ НА ТУБЕРКУЛІН У НЕБЛАГОПОЛУЧНОМУ ЩОДО ТУБЕРКУЛЬОЗУ ВРХ ГОСПОДАРСТВИ

Скрипник А.В., Зав городній А.І.

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

*У статті викладено результати культурально-морфологічних та молекулярно-генетичних досліджень штаму, який було ізольовано з лімфовузлів корови, що реагувала на туберкулін у неблагополучному щодо туберкульозу ВРХ господарстві, і який диференційовано за допомогою секвенування гіперваріабельного локусу 16S рибосомальної РНК як *Mycobacterium elephantis*. Показано необхідність застосування молекулярно-генетичних методів для видової диференціації атипичних мікобактерій, що зумовлюють сенсibiliзацію ВРХ до туберкуліну, і визначення природи параалергічних реакцій.*

Одним з головних заходів при оздоровленні неблагополучних щодо туберкульозу господарств є своєчасне виявлення і вилучення зі стада хворих тварин. Діагноз туберкульозу при цьому ґрунтується на результатах комплексних досліджень

за допомогою алергічного, патологоанатомічного та бактеріологічного методів; основним методом захиттєвої діагностики є алергічний [1, 2, 3].

Алергічна діагностика на туберкульоз ускладнюється наявністю неспецифічних реакцій на туберкулін для ссавців, зумовлених непатогенними для тварин атипovими мікобактеріями [4], коли при забої не знаходять характерних туберкульозних уражень, а при бактеріологічному дослідженні патологічного матеріалу отримують негативні результати або виділяють культури атипovих мікобактерій [1, 2, 5, 6, 7, 8].

Позитивна реакція на туберкуліновий тест є підставою для забою реагуючих тварин, що, природно, призводить до великих економічних втрат у тваринництві.

Тим часом в Україні протягом останніх десятиліть питома вага атипovих мікобактерій, що виділяються від ВРХ лабораторіями ветеринарної медицини, зростає: від 15,1 % (від загальної кількості виділених культур) у 1984 році [6] до 81,25 % у 2007 році [9]. В багатьох господарствах етіологічний фактор реактивності ВРХ до туберкуліну залишається не встановленим [10].

Поява нових молекулярно-генетичних методів діагностики туберкульозу дозволяє успішно вирішувати цю проблему.

Секвенування послідовності гену 16S рРНК штаму мікобактерій, ізольованого з абсцесу легенів померлого слона, дозволило характеризувати його як новий вид *Mycobacterium elephantis* [11]. Пізніше ще 14 штамів *M. elephantis* було ізольовано з мокроти, грануломатозної тканини пахвового лімфатичного вузла та бронхіального аспірату людей в Канаді, Бельгії та Італії [12, 13, 14].

*Mycobacterium elephantis* характеризується від швидкої до помірної швидкістю росту колоній, від 3 до 10 діб, наявністю блідо-жовтого пігменту, який з часом стає більш інтенсивним (скотохромоген), здатністю рости за температури 25–45 °С, причому ріст колоній швидше за температури 42 °С. Колонії ростуть у вигляді гладких безпігментних S-форм або мають жовтуватий колір [12, 15].

З точки зору молекулярної діагностики *M. elephantis* має маркери специфічності послідовності гену 16S рибосомальної РНК (рРНК), індивідуальний патерн рестрикції у рестрикційно-ензимному аналізі *hsp-65* та специфічний профіль вискоєфективної рідинної хроматографії [14, 15].

Клінічне та епідеміологічне значення *M. elephantis* є під питанням, попри встановлену роль цього мікроорганізму у загибелі слона та його ізолювання з лімфатичного вузла людини [14].

**Матеріали і методи.** Культуру ізольовано з лімфатичних вузлів корови, яка утримувалася у неблагополучному щодо туберкульозу господарстві Миронівського району Київської області. Культивування проводили на 3 живильних середовищах: рідкому (бульйон 7Н9 Meaddebrook) та яєчних (Stonebrink з піруватом та Ogawa з гліцеролом). Пробірки з посівами інкубували за температури 37–38 °С в аеробних умовах.

Мікроскопію мазків, пофарбованих за методом Циля-Нільсена, проводили за загальноприйнятою методикою.

ДНК екстрагували способом обробки клітин високою температурою [16]. Видову диференціацію мікобактерій проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції [17] та секвенування.

Секвенували фрагмент гену 16S рибосомальної РНК, що містить гіперваріабельну ділянку А. Фрагмент напрацьовували у ПЛР з використанням праймерів M285 (GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG) та M264 (TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA) за такою програмою: первинна денатурація – 96 °С, 60 секунд; денатурація – 96 °С, 30 секунд; відпал – 58 °С, 60 секунд; елонгація – 72 °С, 60 секунд; фінальна елонгація – 72 °С, 300 секунд; кількість циклів – 35.

Мастер-мікс на 1 пробу містив: 5 мкл буфера для ПЛР (10x); 2 мкл суміші дНТФ (концентрація 2 мМ); по 1 мкл розчинів праймерів (концентрація 20 пМ); 0,2 мкл полімерази (5 од/мкл); 39,8 (38,8) мкл води для ПЛР. Зразок ДНК вносили в об'ємі 1–2 мкл.

ПЛР-продукт очищували за допомогою Qiagen PCR Purification Columns з набору QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Німеччина) та використовували як матрицю для

сиквенс-ампліфікації з праймером M285 та з застосуванням мастер-міксу «Terminator Ready Reaction Mix (Big Dye)» (ABI PRISM Dye Terminator Cycle-Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems) згідно з інструкцією виробника. Автоматичне секвенування ДНК здійснювали на секвенаторі ABI PRISM 310 Genetic Analyser, США.

Визначення виду досліджуваних мікобактерій здійснювали за допомогою алгоритму BLASTN у базі даних GenBank nr/nt [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) [18]).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Досліджувану культуру мікобактерій ізольовано з лімфатичних вузлів корови, що реагувала на введення туберкуліну для ссавців.

В результаті рекультивування досліджуваної культури помутніння бульйону спостерігалось на 4 добу, поява видимих колоній на твердих середовищах – на 4–5 добу після інокуляції.

Над поверхнею бульйону досліджувана культура формувала плівку, бульйон залишався впродовж часу спостереження більш-менш прозорим, що свідчить про аерофільність цієї культури. З часом на поверхні бульйону утворювались великі конгломерати клітин, які під власною вагою осідали на дно пробірки, утворюючи осад жовтувато-кремового кольору.

На твердих живильних середовищах досліджувана культура росла у вигляді вологих і гладких колоній (S-форма) з пігментом жовтувато-кремового кольору.

У результаті мікроскопії препарату досліджуваної культури були знайдені кислотостійкі клітини у формі коротких кокоподібних паличок блідо-червоного кольору, що свідчить про їх відносно слабку кислотостійкість.

Полімеразна ланцюгова реакція з ДНК, екстрагованої з досліджуваної культури, була позитивна з родоспецифічними праймерами, однак негативна з праймерами, специфічними *M. tuberculosis complex*, *M. avium complex* та *M. intracellulare*.

За результатами аналізу ступеня ідентичності секвенованої послідовності гіперваріабельної ділянки А гену 16S рРНК з послідовностями ДНК, що зберігаються у GenBank, визначено, що найбільш спорідненими до неї є послідовності гену 16S рРНК штамів *Mycobacterium elephantis* AF385898, AJ536100 та AJ010747.

**Висновки.** Проведеними дослідженнями встановлено, що реакція тварини на туберкулін для ссавців була зумовлена *Mycobacterium elephantis*. Секвенування послідовності гена 16S рРНК є преференційним методом для видової диференціації *M. elephantis*.

Наведені у статті дані є першим повідомленням про ізолювання *Mycobacterium elephantis* від великої рогатої худоби.

Розширення методологічної бази діагностики туберкульозу тварин в Україні, зокрема, застосування новітніх молекулярно-генетичних методів, таких як полімеразна ланцюгова реакція та секвенування, відкриває можливості вивчення поширення видів мікобактерій в Україні та визначення їх епізоотологічного значення для сільськогосподарських тварин на якісно новому рівні.

Висловлюємо подяку Dr. H. Hotzel, Dr. I. Moser, Dr. K. Sachse, всім співробітникам Friedrich-Loeffler-Institut (Jena, Germany), а також Німецькій службі академічних обмінів (DAAD).

#### Список літератури

1. Туберкулез животных и меры борьбы с ним [Текст] / Ю.Я. Кассич [и др.]. – Киев: “Урожай”, 1990. – 304 с.
2. Щодо вирішення проблеми атипичних мікобактерій у скотарстві України [Текст] / Ю. Касіч [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 1999. – № 11. – С. 12–14.
3. Реабілітаційні заходи у господарствах щодо туберкульозу великої рогатої худоби [Текст] / Ю. Касіч [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2002. – № 1. – С. 13–14.
4. Горжеев В.М. Епізоотологічний моніторинг та удосконалення системи боротьби з туберкульозом великої рогатої худоби у господарствах України [Текст] / В.М. Горжеев: дис. ... канд. вет наук / Ін-т експерим. і клин. вет. медицини. – Х., 2005. – 126 с.
5. Завгородний А.И. Атипичные микобактерии у крупного рогатого скота в зоне лесостепи и степи УССР [Текст] / А.И. Завгородний: автореф. дис. ...канд. вет. наук / Ин-т эксперим. и клин. вет. медицины. – Харьков, 1987. – 22 с.
6. Завгородний, А.И. Виды микобактерий, распространенных в хозяйствах Украины, и их эпизоотологическое значение [Текст] / А.И. Завгородний: автореф. дис. ... д-ра вет. наук / Ин-т эксперим. и клин. вет. медицины. – Харьков, 1997. – 34 с.
7. Тяжнас К.К. Изучение парааллергических туберкулиновых реакций и вызывающих их атипичных микобактерий у молодняка крупного рогатого скота [Текст] /

К.К. Тяхнас: автореф. дис. ...д-ра. вет. наук / Эстонский научно-исследовательский институт животноводства и ветеринарии – Таллин. – 1975. – 35 с. **8.** Шишков В.П. Туберкулез сельскохозяйственных животных [Текст] / В.П. Шишков, В.П. Урбан. – М.: Агропромиздат, 1991. – 255 с. **9.** Скрипник А.В. Молекулярно-генетична диференціація мікобактерій, виділених в Україні, та їх філогенетичні взаємозв'язки [Текст] / А.В. Скрипник: дис... канд. вет. наук / Нац. наук. центр «Ін-т експерим. і клін. вет. медицини». – Х., 2007. – 182 с. **10.** Динаміка епізоотологічного процесу при мікобактеріальних інфекціях великої рогатої худоби в господарствах Причорномор'я [Текст] / Н. Селіщева [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2006. – № 12. – С.12-14. **11.** *Mycobacterium elephantis* sp. nov., a rapidly growing non-chromogenic mycobacterium isolated from an elephant [Text] / H. Shojaei [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2000. – Vol. 50. – P.1817-1820. **12.** Phenotypic and Molecular Characterization of Clinical Isolates of *Mycobacterium elephantis* from Human Specimens [Text] / C. Turenne [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40, 4. – P.1230-1236. **13.** Recovery of *Mycobacterium elephantis* from Sputum of a Patient in Belgium [Text] / D. Potters [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 41, 3. – P.1344. **14.** *Mycobacterium elephantis*: Not an Exceptional Finding in Clinical Specimens [Text] / E. Tortoli [et al.] // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2003. – Vol. 22. – P.427-430. **15.** Tortoli E. Impact of genotypic studies on *Mycobacterial* taxonomy: the new *Mycobacterium* of the 1990s / E. Tortoli // Clin. Microbiol. Rev. – 2003. – Vol. 16. – P.319-354. **16.** Деклараційний патент № 8094 Україна, МКИ (2005) G01N33/00. Спосіб виділення ДНК мікобактерій з живильних середовищ для діагностики туберкульозу та мікобактеріозів у полімеразній ланцюговій реакції [Текст] / Стегній Б.Т., Скрипник А.В., Скрипник В.Г.; заявник та патентовласник Нац. наук. центр «Ін-т експерим. і клін. вет. медицини». – № 200500408; заявл. 17.01.05; опубл. 15.07.05, Бюл. № 7. – 2 с. **17.** Деклараційний патент № 3080 Україна, МКИ (2004) G01N33/00. Спосіб діагностики туберкульозу та мікобактеріозів тварин [Текст] / Стегній Б.Т., Коваленко А.М., Скрипник А.В., Скрипник В.Г.; заявник та патентовласник Нац. наук. центр «Ін-т експерим. і клін. вет. медицини». – № 2004010182; заявл. 09.01.04; опубл. 15.10.04, Бюл. № 10. – 2 с. **18.** GenBank [Текст] / D.A. Benson [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2005. – Vol. 1, № 33 (Database issue). – P. 34-38.

## MOLECULAR-GENETIC DIFFERENTIATION OF *MYCOBACTERIUM ELEPHANTIS* STRAIN ISOLATED FROM COW REACTED TO TUBERCULIN IN WITH BOVINE TB FARM

Skrypyk A.V.

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

*The article presents results of cultural-morphological and molecular-genetic investigation of strain isolated from lymph nodes of cow kept in bovine TB infected farm which reacted on tuberculin administration. The strain was differentiated by sequencing of hypervariable region of 16S ribosomal RNA as *Mycobacterium elephantis*. Necessities of application of molecular-genetic methods for species differentiation of atypical mycobacteria causing cattle sensibilization to tuberculin as well as for defining of the nature of paraallergic reactions are shown.*

УДК 619:616.578

## СТАН АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В КРОВІ КОНЕЙ, ХВОРИХ НА ІНАН

Сокирко Т.О., Синицин В.А., Попова Е.М.

Інститут ветеринарної медицини УААН, м. Київ

*Відмічено порушення ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантного захисту в крові хворих на ІНАН коней, що негативно впливає на процеси обміну та призводить до зниження загальної резистентності тварин.*

В Україні з розвитком інфраструктури конезаводів та приватних господарств, де вирощують племінний молодняк коней для продажу, у тому числі і за кордон, постають проблеми захисту тварин від інфекційних захворювань, які завдають їм суттєвої шкоди, знижуючи племінну та спортивну цінність коней. Найбільшу небезпеку становлять вірусні захворювання, зокрема, інфекційна анемія коней (ІНАН), яка відноситься до так званих повільних інфекцій. Це захворювання є складною проблемою. Висока летальність, довготривале вірусоносійство, відсутність засобів профілактики ІНАН потребують удосконалення існуючих та розробки і впровадження нових методів діагностики цього захворювання [3]. Не повністю вивчене поширення захворювання на ІНАН коней в Україні, не розроблені підходи до прогнозування та профілактики. Актуальним є визначення біохімічних показників, репрезентативних при захворюваннях вірусної етіології у коней, зокрема, при ІНАН. Нашими попередніми