

## Розділ 6. Внутрішні незаразні хвороби та клінічна біохімія

УДК 619:616.98:879.873.21:636.2-07

### ВИВЧЕННЯ КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГІЧНИХ, БІОХІМІЧНИХ І БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ АТИПОВИХ МІКОБАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ВІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В ГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ

Завгородній А.І., Котляр О.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: sanya.kotlyar.00.@mail.ru

*У статті наведені результати планового дворічного обстеження алергічним методом 1990 голів великої рогатої худоби на туберкульоз у господарствах зон степу та лісостепу України. Реагуючими на туберкулін (ППД) для ссавців виявили 70 голів, які з діагностичною метою були забиті та дослідженні патологоанатомічним методом. Характерних для туберкульозу змін в органах не виявили, а при бактеріологічних висівах з них ізолювали 13 видів атипичних мікобактерій, які на підставі культурально-морфологічних, біохімічних і біологічних тестів, а також після порівняння їх характеристик з відповідними лабораторними референтними культурами мікобактерій, були віднесені до трьох груп (крім першої) за класифікацією Раньона.*

**Ключові слова:** туберкульоз, велика рогата худоба, діагностика, туберкулін (ППД) для ссавців, алерген із атипичних мікобактерій (ААМ), атипичні мікобактерії.

Туберкульоз великої рогатої худоби завдає великих економічних збитків галузі тваринництва та несе загрозу для здоров'я людей. В окремих зонах туберкульоз має значне поширення серед людей, а тому не виключена можливість заносу збудника інфекції у благополучні господарства [7]. Своєчасна діагностика, профілактика та оздоровлення поголів'я ВРХ від туберкульозу є першочерговою задачею ветеринарної науки і практики.

Головним методом прижиттєвої діагностики туберкульозу ВРХ є алергічна внутрішньошкірна проба з застосуванням туберкуліну (ППД) для ссавців. У благополучних щодо захворювання на туберкульоз господарствах нерідко виявляють реагуючих на туберкулін тварин, у яких при діагностичному забої не знаходять характерних для туберкульозу уражень. При бактеріологічному дослідженні біологічного матеріалу, відібраного від таких тварин, збудника туберкульозу не виділяють, а не рідко виділяють атипичні мікобактерії [3, 4, 7]. Встановлення природи сенсibiliзації макроорганізму до туберкуліну залежить від якості проведення лабораторних досліджень і швидкості ідентифікації культур мікобактерій [5, 6, 9].

Виділення та визначення видової належності культур мікобактерій з організму тварин і об'єктів зовнішнього середовища дозволяє встановити ареал їх поширення, джерела інфікування та патогенні властивості для різних видів тварин [1, 2, 8]. Проведення постійного епізоотологічного моніторингу в гуртах ВРХ для визначення видової належності мікобактерій дозволить своєчасно визначити епізоотичний статус господарств і проводити необхідні спеціальні ветеринарно-санітарні та організаційно-господарські профілактичні заходи.

**Мета роботи.** Вивчення культурально-морфологічних, біохімічних і біологічних властивостей мікобактерій виділених у господарствах від великої рогатої худоби.

**Матеріали та методи.** Алергічні дослідження ВРХ проводили згідно «Методическим рекомендаціям по уточнению диагноза на туберкулез у КРС благополучных хозяйств и определению видовой принадлежности культур микобактерий» (1997). Бактеріологічне дослідження біологічного матеріалу, відібраного від забитих з діагностичною метою тварин, проводили згідно «Настанови по діагностиці туберкульозу тварин та птиці» (1994).

Передпосівну обробку проб ґрунту з пасовищ і змивів з годівниць, стін, гнійних риштаків проводили 18 %  $H_2SO_4$ , після чого отриману завесь з кожної проби окремо висівали у п'ять пробірок з поживним середовищем для культивування мікобактерій. Культурально-морфологічні та біохімічні властивості вивчали у 46 культур атипичних мікобактерій виділених від реагуючої на туберкулін ВРХ, 11 культур мікобактерій, одержаних із державних обласних лабораторій ветеринарної медицини, 12 культур виділених із об'єктів зовнішнього середовища. Для встановлення видової належності культур мікобактерій були вивчені наступні властивості: швидкість і характер росту на середовищі для культивування мікобактерій за температури 25, 37 і 45 °С, морфологія колоній, тінкторіальні властивості, ріст на яєчному поживному середовищі з саліцилатом натрію, толерантність до 5 % NaCl за методом

(Kestle D., 1967), визначення каталазної активності за методом (Middlebrook C., 1954), реакція редукції телуриту калію за методом (Kulburn J. et al., 1969), реакція гідролізу твін – 80 за методом (Wayne G. 1962), амідазна активність за методом (Taequet A. et al. 1967) у модифікації (Ільїної А.Б. 1978).

При ідентифікації виділених культур мікобактерій в якості контролю також використовували референтні штами культур мікобактерій (*M. bovis*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. gordone* *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. vaccae*, *M. flavescens*, *M. diernhoferi*), які знаходяться в колекції культур лабораторії вивчення туберкульозу ННЦ «ІЕКВМ».

Біологічні властивості культур мікобактерій досліджували на 210 здорових морських свинках масою 300–350 грамів, не реагуючих на туберкулін (ППД) для ссавців та ААМ. Із бактеріальної маси кожної виділеної культури мікобактерій готували завись в концентрації 1 мг/мл стерильного фізіологічного розчину. Морських свинок заражали підшкірно в ділянці лівого стегна в дозі 1 см<sup>3</sup>.

**Результати досліджень.** При алергічному дослідженні 1990 голів ВРХ позитивні реакції на туберкулін виявили у 70 голів, які були забиті з діагностичною метою. При розтині та патологоанатомічному дослідженні в органах і лімфатичних вузлах характерних для туберкульозу уражень в жодному випадку не було виявлено.

Виділені культури мікобактерій в мазках, пофарбованих за методом Ціля-Нільсона, мали вигляд прямих, довгих і коротеньких, а іноді зігнутих яскраво-червоного кольору паличок, деякі з них мали зернисті включення та розташовувались у полі зору окремо або групами. Ізольовані культури мікобактерій при першому пасажі виростили на 6–20 добу за температури 37 °С. За характером росту та морфологією колоній ізольовано 69 культур мікобактерій, які виростили на поживному середовищі для культивування мікобактерій у вигляді вологих, гладких, блискучих колоній маслянистої консистенції з рівними краями, не мали фотохромогенних властивостей та добре суспендувались у фізіологічному розчині. На підставі цього чотири ізольовані культури мікобактерій було віднесено до другої групи, 11 культур – до третьої і 54 культури – до IV групи за класифікацією Раньона.

Три культури скотохромогенних мікобактерій повільно виростили на яєчному поживному середовищі для культивування мікобактерій та з додаванням саліцилату Na за температури 25, 37 °С. Не росли за температури 45 °С та з 5 % хлористим натрієм, а також не гідролізували твін-80. При культивуванні утворювали оранжевий пігмент у темряві та на світлі, мали добре виражену каталазну активність, позитивні реакції з нікотинамідом та піразінамідом. Культури мікобактерій зумовлювали підвищену чутливість сповільненого типу у морських свинок до туберкуліну (ППД) для ссавців та ААМ. Такі властивості були відмічені у референтного штаму *M. scrofulaceum*, що і стало підставою віднести виділені культури до цього виду мікобактерій.

Одна ізольована культура мікобактерій повільно росла на щільному яєчному середовищі за температури 25 °С, 37 °С та з додаванням саліцилату Na, утворювала жовтий пігмент у темряві та на світлі, обумовлювала короточасну сенсibilізацію у морських свинок до туберкуліну і ААМ, мала високу каталазну активність та гідролізувала твін-80. Не росла на середовищі для культивування мікобактерій за температури 45 °С та з додаванням 5 % хлористого натрію, не давала реакцію з телуритом калію, нікотинамідом, піразінамідом. За вивченими властивостями виділена культура мікобактерій мала ідентичні показники з музейною культурою *M. gordone*.

Дві культури мікобактерій зумовлювали короткострокову сенсibilізацію у морських свинок лише до ААМ. При культивуванні добре росли на яєчному середовищі за температури 25, 37 °С та з додаванням саліцилату Na. Мали позитивну каталазну активність, гідролізували твін-80 та відновлювали телурит калію. На середовищі з 5 % NaCl та за температури 45 °С росту не відмічали, також відсутні реакції з нікотинамідом і піразінамідом. На підставі порівняння вивчених властивостей ізольованих культур мікобактерій з музейними їх було віднесено до виду *M. terrae*.

П'ять інших нефотохромогенних культур мікобактерій погано росли за температури 25 °С, а при культивуванні за температури 37 °С і 45 °С відмічали суцільний ріст на поверхні поживного середовища. Давали позитивні реакції з телуритом калію, нікотинамідом і піразінамідом. Не росли на середовищі з 5 % хлористим натрієм, мали негативну каталазну активність та реакцію гідролізу твін-80. Обумовлювали сенсibilізацію морських свинок до туберкуліну і ААМ, до 30 доби викликали загибель кролів. Властивості референтної культури *M. avium* були ідентичні з ізольованими культурами мікобактерій, що було підставою віднести їх до цього виду.

Чотири культури росли на поживному середовищі за температури 25, 37 і 45 °С, а з саліцилатом Na та 5 % NaCl не росли. Не давали реакцій з твін-80, телуритом калію та каталазою. Культури давали позитивні реакції з нікотинамідом і піразінамідом. Алергічних реакцій у морських свинок на туберкулін і ААМ не викликали. Властивості ізольованих культур мікобактерій співпадали з показниками референтного штаму *M. xenopi*, що й було підставою віднести їх до цього виду.

Із 54 швидкозростаючих культур мікобактерій дев'ять культур давали ріст на поживному середовищі для культивування мікобактерій на 3–5 добу за температури 25, 37 °С і 45 °С та з додаванням саліцилату Na та 5 % хлористого натрію. Культури давали позитивні реакції з телуритом калію, нікотинамідом, піразінамідом, а також мали каталазну активність і гідролізували твін-80. Обумовлювали сенсibilізацію

у морських свинок до туберкуліну та ААМ. Ізольовані культури мали аналогічні властивості з референтним штамом *M. smegmatis*, що й дозволило віднести їх до цього виду.

При дослідженні трьох швидкоростучих культур, які добре росли на поживному середовищі для культивування мікобактерій за температури 25, 37 °С та 45 °С з утворенням жовтого пігменту як у темряві, так і на світлі та з додаванням до яєчного середовища 5 % хлористого натрію і саліцилату Na. У культур відмічали позитивні реакції з нікотинамідом, піразінамідом, вони мали каталазну активність і гідролізували твін-80. Обумовлювали сенсibilізацію у морських свинок до туберкуліну та ААМ. На підставі отриманих даних і в порівнянні з референтним штамом ізольовані культури віднесено до виду *M. phlei*.

П'ятнадцять швидкоростучих культур мікобактерій росли на поживному середовищі для культивування мікобактерій за температури 25 °С і 37 °С та з 5 % хлористим натрієм і саліцилатом Na. Не росли за температури 45 °С. Культури мали високу каталазну активність та відновлювали телурит калію. Десять культур давали реакції гідролізу твін-80, у одинадцяти відмічали позитивні реакції з нікотинамідом і піразінамідом, чотири не реагували з цими амідами. Такі нестійкі властивості притаманні референтному штаму *M. fortuitum*, який обумовлює у морських свинок сенсibilізацію до туберкуліну та ААМ. На підставі цього досліджувані культури мікобактерій були віднесені до виду *M. fortuitum*.

Вивчені показники дев'яти швидкоростучих культур мікобактерій, які добре росли за температур 25, 37 °С та з додаванням 5 % хлористого натрію і саліцилату Na, не росли за температури 45 °С. Культури утворювали світло-жовтий пігмент, у темряві та на світлі, давали позитивні реакції з телуритом калію, мали каталазну, нікотинамідазну і піразінамідазну активність, гідролізували твін-80, обумовлювали сенсibilізацію у морських свинок до туберкуліну (ППД) для ссавців і ААМ. Властивості виділених культур співпадали з показниками музейного штаму *M. flavescens*, що й дозволило ізольовані культури віднести до цього виду мікобактерій.

Досліджувані шість швидкоростучих культур мікобактерій, які утворювали жовтий пігмент у темряві та на світлі при культивуванні на поживному середовищі за температури 25, 37 °С, а також з 5 % хлористим натрієм і саліцилатом Na, а за температури 45 °С росту не було відмічено. Культури мікобактерій мали високу каталазну активність, гідролізували твін-80 та давали позитивні реакції з нікотинамідом, піразінамідом і телуритом калію. За вивченими властивостями шість культур мікобактерій мали однакові показники з референтною культурою *M. vaccae*, що й дозволило віднести їх до цього виду мікобактерій.

П'ять швидкоростучих культур мікобактерій виростили на поживному середовищі для культивування мікобактерій протягом п'яти днів і з додаванням 5 % NaCl і саліцилату Na. При культивуванні з'являвся жовтий пігмент як у темряві, так і на світлі за температури 25, 37 °С. Відмічали позитивні реакції з нікотинамідом, піразінамідом і з телуритом калію. Не росли за температури 45 °С та не давали реакції з твін-80, обумовлювали у морських свинок короткострокову сенсibilізацію до туберкуліну (ППД) для ссавців і ААМ. Вивчені властивості референтного штаму співпадали з ізолятами, що й дозволило віднести ці шість культур до виду *M. diernhoferi*.

Три культури мікобактерій виростили на поживному середовищі на 3–5 добу з додаванням 5 % хлористого натрію і саліцилату Na за температури 25, 37 °С, утворюючи жовтий пігмент. За температури 45 °С росту не було. Відмічали високу каталазну, нікотинамідазну та пірозінамідазну активність, позитивну реакцію з телуритом калію та твін-80. Встановлена здатність культур мікобактерій обумовлювати короткострокову сенсibilізацію у морських свинок до туберкуліну та ААМ. На підставі вивчених властивостей культур і в порівнянні з референтним штамом три ізольовані культури було віднесено до виду *M. peregrinum*.

Чотири культури мікобактерій росли на поживному середовищі для культивування мікобактерій на 3–5 добу, а з додаванням 5 % хлористого натрію і саліцилату Na лише за температури 25 °С, гідролізували твін-80, мали позитивну нікотинамідазну та піразінамідазну активність, обумовлювали сенсibilізацію морських свинок лише до ААМ. Культури мали низьку каталазну активність та негативну реакцію з телуритом калію. За результатами проведених досліджень ізольовані культури мікобактерій було віднесено до виду *M. thamnphaeos*.

На підставі вивчених культурально-морфологічних і біохімічних властивостей виділені культури мікобактерій було віднесено до трьох груп (II, III і IV групи) за класифікацією Раньона, до другої групи – (*M. gordona* – 1, *M. scrofulaceum* – 3), третьої – (*M. avium* – 5, *M. terrae* – 2, *M. xenopi* – 4) та четвертої – (*M. peregrinum* – 3, *M. fortuitum* – 15, *M. smegmatis* – 9, *M. vaccae* – 6, *M. phlei* – 3, *M. Flavescens* – 9, *M. diernhoferi* – 5, *M. thamnphaeos* – 4).

Нами проведено вивчення здатності різних видів досліджених атипичних мікобактерій викликати підвищення алергічного стану останнього від виду мікобактерій. Так, *M. xenopi* не зумовлювала сенсibilізацію тварин до діагностичних алергенів, *M. diernhoferi*, *M. thamnphaeos*, викликали короткострокову сенсibilізацію лише на ААМ. Інші види мікобактерій зумовлювали підвищену чутливість

сповільненого типу до туберкуліну (ППД) для ссавців і до ААМ. Реакції на ААМ у морських свинок протягом експерименту були виражені інтенсивніше, ніж на туберкулін (ППД) для ссавців.

Культури досліджених нами 13 видів атипичних мікобактерій виявилися не патогенними для морських свинок, що підтверджено постійними спостереженнями за їх фізіологічним станом протягом досліду та відсутністю патологоанатомічних змін при розтині.

**Висновки.** 1. Серед поголів'я ВРХ у благополучних щодо туберкульозу господарствах України, зонах степу та лісостепу реакції на туберкулін (ППД) для ссавців були зумовлені 13 видами атипичних мікобактерій.

2. Встановлено, що деякі виділені види атипичних мікобактерій зумовлювали у морських свинок підвищену чутливість сповільненого типу на туберкулін (ППД) для ссавців, а характерних для туберкульозу патологоанатомічних змін не викликали.

*Список літератури*

1. Гулюкин М. И. Оздоровительные мероприятия при туберкулезе крупного рогатого скота [Текст] / М. И. Гулюкин, А. Х. Найманов, В. А. Ведерников [др.] // Ветеринария. – 2012. - №1. – С. 3-8.
2. Завгородній А. І. Система епізоотологічного моніторингу, діагностики, профілактики та оздоровлення тваринництва України від туберкульозу [Текст] / А. І. Завгородній, Б. Т. Стегній, І. Ю. Бісюк [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2014.-№1. – С. 10-13.
3. Завгородній А. І. Идентификация атипичных микобактерий, выделенных от животных и объектов внешней среды [Текст] / А. И. Завгородний // Ветеринария. Республ. межвед. темат. науч. сб.-К.-1985. Вип. 60.-С. 14-16.
4. Мартма, О.В. Атипичные микобактерии и их диагностическое и эпизоотическое значение при туберкулезе крупного рогатого скота [Текст]: Автореф. дис. д-ра. вет. Наук - 16.00.03 / О.В. Мартма// Тарту., 1971.-46с.
5. Мартма О.В. Парааллергические реакции на туберкулин и их дифференциация. [Текст] / О.В. Мартма, К.К. Тяхнас // Ветеринария.-1978-№ 4. - С. 35-38
6. Найманов А.Х. Аллергическая диагностика микобактериальных инфекций крупного рогатого скота [Текст] / А.Х. Найманов // Автореферат диссертации доктора ветеринарных наук. Москва, 1993. С. 29.
7. Овдиенко, Н.П. Видовая принадлежность микобактерий, выделяемых от крупного рогатого скота и из объектов внешней среды [Текст] / Н.П. Овдиенко, В.И. Косенко, А.Х. Найманов и др. // Пробл. туб.- 1990.- №2.- С.46-48.
8. Ощепков, В. Г. Резервуары атипичных микобактерий в дикой и синантропной фауне Прииртышья [Текст] / В. Г. Ощепков, В. Г. Бордюг, Н. Н. Кошечев [и др.] // Веткорм. – 2012. - №4. – С. 24-26.
9. Юдин Г.А. Методы дифференциации и сенсibiliзирующих свойств микобактерий [Текст] / Г.А. Юдин // Ветеринария.-1966.-№5. - С. 25-28.

**STUDY CULTURE-MORPHOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF ATYPICAL MYCOBACTERIA ISOLATED FROM CATTLE IN ECONOMY OF UKRAINE**

**Zavgorodniy A.I., Kotlyar A.V.**

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

*The aim was to study culture-morphological, biochemical and biological properties of mycobacteria isolated from farms in Ukraine.*

*Cultural and biochemical properties were studied in 46 cultures of atypical mycobacteria isolated from tuberculin reacting cattle, and 11 mycobacterial cultures obtained from the state regional laboratories of veterinary medicine and 12 cultures isolated from environmental objects. Biological properties of isolates of mycobacteria were studied in two experiments on 210 healthy guinea pigs weighing 300-350 and 12 rabbits weighing 1,500-2,500 grams.*

*Based on the study of culture-morphological and biochemical properties of isolates of mycobacteria were assigned to 13 species (II, III and IV) group classification Runyon.*

*Culture of atypical mycobacteria 13 species are not pathogenic for guinea pigs, which was confirmed postmortem examination. When biostudy five crops species *M. avium* in rabbits, installed septic tuberculosis.*

*Of cattle tuberculosis in prosperous farms in Ukraine, located in the steppe and forest-steppe zones, reaction to tuberculin (PPD) for mammals was caused by 13 kinds of atypical mycobacteria. Found that isolated mycobacterial species can cause guinea pigs delayed type hypersensitivity to tuberculin (PPD) for mammals, and pathological changes characteristic of tuberculosis do not cause*

**Keywords:** Tuberculosis, cattle, diagnosis, tuberculin (PPD) for mammalian allergen of atypical mycobacteria (AAM), atypical mycobacteria.