

ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

АЛЕКСЄЄВА НАТАЛІЯ ВІКТОРІВНА

УДК: 619:616.98:579.873.21:57.083.32:636.5

**РОЗРОБКА ТА УДОСКОНАЛЕННЯ ЗАСОБІВ
СПЕЦИФІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ПТИЦІ**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата ветеринарних наук

Одеса – 2009

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в лабораторії вивчення туберкульозу Національного наукового центру “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини”.

Науковий керівник: доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент УААН **Завгородній Андрій Іванович**, Національний науковий центр „Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини”, завідувач лабораторії вивчення туберкульозу тварин.

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор **Буряк Євген Іванович**, Одеський державний аграрний університет, завідувач кафедри мікробіології і вірусології;

кандидат ветеринарних наук, доцент **Пономаренко Геннадій Володимирович**, Харківська державна зооветеринарна академія, доцент кафедри епізоотології та ветеринарного менеджменту

Захист дисертації відбудеться 02.07.2009 р. о 14 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради К.41.372.01 в Одеському державному аграрному університеті за адресою: 65012, м. Одеса, вул. Пантелеймонівська, 13, навчальний корпус № 3, ауд. 309.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеського державного аграрного університету за адресою: 65039, м. Одеса, пер. Матросова, 6.

Автореферат розісланий 30.05.2009 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

С.І. Масленікова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Сучасні птахівничі підприємства можуть бути рентабельними тільки в тому разі, якщо вони укомплектовані здоровим і високопродуктивним поголів'ям птиці. Тому одним з найважливіших завдань ветеринарної науки й практики є оздоровлення від інфекційних захворювань неблагополучних господарств і постійний контроль епізоотичної ситуації щодо вірус-бактеріальних інфекцій, зокрема і щодо туберкульозу (Hejlícek K., Tremł F., 1993; Kamerbeck J., 1997; Бусол В.О. та ін., 2002; Буряк Є.І., Лісовий І.П., 2003).

З літературних джерел відомо, що постійна циркуляція збудника туберкульозу на поголів'ї дикої птиці, а також безліч факторів передачі *M. avium* забезпечують підтримку осередків цієї інфекції в природі, що створює постійну загрозу зараження сприйнятливих до туберкульозу *M. avium* тварин і птиці, а також людей (Благодарний Я.А., 1980; Ільїна Т.Б., 1982; Mutalib A., Riddell C., 1988; Ковальов Г.К., 1994). В окремих публікаціях наводяться дані про виділення збудника туберкульозу *M. avium* від хворих курей і трансваріальний шлях його передачі здоровим тваринам (Осташко Ф.І., 2001; Романенко В.П., Вербицький П.І., 2002; Микитин О.О., 2003)

Для забезпечення стійкого благополуччя щодо туберкульозу птиці в птахогосподарствах України усіх форм власності необхідно здійснювати моніторинг епізоотичної ситуації щодо цього захворювання з метою своєчасного виявлення джерела збудника інфекції і проведення заходів з недопущення занесення інфекції в благополучні стада (Kettler P.J. et al., 1981; Козлов М.М., 1983; Gots K. et al., 1986; Овдієнко М.П., 1990; Grange J. et al., 1990; Завгородній А.І., 1997; Ткаченко О.А., 2002).

Для моніторингу епізоотичної ситуації щодо туберкульозу птиці в нашій країні, як і в багатьох країнах світу, у виробництво впроваджені методи алергічної діагностики із застосуванням туберкуліну очищеного (ППД) для птиці, але відомо, що на ранніх стадіях інфекційного процесу (10 - 20 діб) та за генералізованої форми туберкульозу, ця проба не забезпечує повного виявлення хворої на туберкульоз птиці. Ряд дослідників запропонували використовувати методи серологічної діагностики, які дозволяють виявляти анергічну до туберкуліну хвору птицю. Це вимагає розробки і впровадження в практику високоспецифічного діагностичуму для постановки серологічних тестів (Anz W. et al., 1980; Samuel A.M. et al., 1984; Romein F. et al., 1985).

З метою забезпечення бактеріальною масою процесу виробництва діагностичних препаратів виникає необхідність в оптимізації умов їх ліофільної сушки з використанням захисного середовища для збереження колекції продуктивних штамів *M. avium* (Mackenzie A.P., 1985; Malik K.A., Hoffmann P., 2003).

Вирішення цих питань особливо актуальне в процесі розробки та удосконалення засобів специфічної діагностики туберкульозу птиці, оцінки їх активності й специфічності, що є необхідною умовою здійснення моніторингу епізоотичної ситуації щодо туберкульозу птиці на території України.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася згідно з тематичними планами наукових досліджень Національного наукового центру “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини” ННЦ ІЕКВМ на 2001 - 2005 роки за завданням “Розробити систему заходів боротьби з туберкульозом сільськогосподарських тварин в умовах реформування тваринництва” (номер державної реєстрації 0101U001615) та за завданням на 2006 - 2010 рр. “Вивчити біологію збудників туберкульозу, особливості епізоотичного та інфекційного процесів, розробити нові методи профілактики, діагностики і боротьби з туберкульозом тварин” (номер державної реєстрації 0106U000351).

Мета і задачі досліджень. Метою роботи було вивчення епізоотичної ситуації щодо туберкульозу птиці в господарствах різних форм власності, виділення культур *M. avium*, вивчення їх протеїногенних і антигенних властивостей, розробка антигена для постановки ККРА та оптимізація умов зберігання *M. avium* для забезпечення виробництва засобів специфічної діагностики.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- проаналізувати епізоотичну ситуацію щодо туберкульозу птиці та виділення культур *M. avium* з патологічного матеріалу від сільськогосподарських тварин та птиці;

- вивчити морфологічні ознаки, біохімічні, культуральні та біологічні властивості виділених з патологічного матеріалу культур *M. avium*;

- виділити протеїногенний штам, придатний для виробництва туберкуліну (ПД) для птиці;

- розробити методику виготовлення антигена для постановки ККРА;

- оптимізувати умови ліофільної сушки антигенних і протеїногенних штамів *M. avium* для виробництва засобів специфічної діагностики.

Об'єкт дослідження: туберкульоз; засоби специфічної діагностики туберкульозу птиці.

Предмет дослідження: морфологічні, тинкторіальні, культуральні, біохімічні, біологічні, протеїногенні та антигенні властивості *M. avium*, живильні середовища для виділення й культивування мікобактерій, виготовлення засобів специфічної діагностики туберкульозу птиці, вивчення їх активності і специфічності на поголів'ї хворої на туберкульоз птиці, а також визначення життєздатності ліофілізованих культур *M. avium*.

Методи досліджень. У роботі використовували ретроспективний епізоотологічний аналіз і методи бактеріоскопічного, бактеріологічного, біохімічного, біологічного, патологоанатомічного, серологічного, алергічного та статистичного досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше за 20 років здійснено аналіз епізоотичної ситуації щодо туберкульозу птиці в Україні і результатів виділення *M. avium* з біоматеріалу від сільськогосподарських тварин.

Установлена захворюваність птиці туберкульозом в птахогосподарствах різних форм власності в межах від 0,06 % до 2,56 %, а в особистих підсобних господарствах громадян - від 3,3 до 89 % випадків.

Уперше від хворої на туберкульоз птиці виділено й селекціоновано протейногенний штам *M. avium*-ЗСП-93, перспективний для виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для птиці в стандартному розчині, який задепоновано в ДНКІБШМ.

Розроблена методика отримання специфічного антигена з *M. avium* та визначена його ефективність в ККРА при дослідженні птиці на туберкульоз.

Уперше оптимізовані умови зберігання штамів *M. avium* на захисно-суспензійному середовищі й визначена оптимальна концентрація бактеріальної зависі та режим ліофілізації, що забезпечує життєздатність *M. avium* до 70 %-72 % упродовж 18 місяців.

Вивчено вплив процесу ліофілізації на основні біологічні властивості *M. avium* та рівень життєздатності впродовж терміну зберігання.

Практичне значення одержаних результатів. Практичне значення роботи полягає в тому, що селекціоновано і задепоновано протейногенний штам *M. avium* ЗСП – 93, перспективний для виготовлення туберкуліну (ППД) для птиці та антигена для постановки ККРА.

Запропонована схема ліофілізації *M. avium*, яка забезпечує збереження основних біологічних властивостей та високу життєздатність *M. avium* як на етапах процесу ліофілізації, так і впродовж терміну зберігання.

За результатами досліджень розроблено “Методичні рекомендації з ліофілізації мікобактерій пташиного виду”, які ухвалені методичною комісією з інфекційної патології ННЦ “ІЕКВМ” протокол № 6 від 2.11.06 р. і затверджені науково-методичною радою Державного департаменту ветеринарної медицини України, протокол № 3 від 20.12.06 р.

Матеріали дисертації використані при розробці „Інструкції з профілактики та ліквідації туберкульозу птиці”, затверджені Департаментом ветеринарної медицини України 28.08.06 р., та нормативної документації на виготовлення антигена для діагностики туберкульозу птиці в ККРА - (ТУ У 24.4-00497087-075:2009).

Особистий внесок здобувача полягає в безпосередньому виконанні всього обсягу робіт за темою дисертації, а саме: аналізу літературних джерел, підборі методів та методик, здійсненні наукових експериментів, статистичної обробки й аналізу первинних даних, узагальненні результатів власних досліджень, формулюванні наукових положень і висновків. Вивчення морфологічних, тинкторіальних, біохімічних, культуральних, біологічних та протейногенних властивостей ізольованих культур мікобактерій, а також виготовлення антигена з *M. avium* і постановка ККРА в дослідах на здоровій і хворій на туберкульоз птиці здійснювалися спільно з керівником та провідним науковим співробітником лабораторії вивчення туберкульозу ННЦ ІЕКВМ, кандидатом ветеринарних наук Позмоговою С.А.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідались, обговорювались та отримали схвалення на звітних сесіях вченої ради ННЦ ІЕКВМ за підсумками роботи у 2004 - 2008 рр., м. Харків;

- щорічних звітних наукових конференціях Луганського НАУ за підсумками роботи (2004-2008 рр.);

- науково-практичному семінарі з питань ветеринарної медицини птахівництва (17 червня 2004 року, м. Луганськ);
- всеукраїнській конференції студентів, магістрантів і аспірантів „Майбутнє ветеринарної медицини, біології та біотехнології” (26-28 квітня 2005 року, м. Луганськ);
- міжнародній науково-практичній конференції „Молоді вчені у вирішенні проблем аграрної науки і практики” (2006 рік, м. Львів);
- VII конференції з птахівництва з міжнародною участю (18-22 вересня 2006 року, м. Алушта);
- VI з'їзді паразитоценологів України з міжнародною участю (11-13 жовтня 2006 року, м. Харків);
- міжнародній науково-практичній конференції „Регіональні проблеми екології ветеринарної медицини (24-25 жовтня 2007 року, м. Житомир);
- науково-практичній конференції, присвяченій 10-річчю заснування факультету ветеринарної медицини Луганського НАУ (26-27 жовтня 2007 року, м. Луганськ).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових праць, у тому числі 11 - у фахових наукових виданнях, перелік яких затверджено ВАК України, з них 3 – одноосібних, методичні рекомендації та ТУ.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 166 сторінках друкованого тексту і складається з таких розділів: вступ, огляд літератури, матеріали й методи, власні дослідження, аналіз та узагальнення одержаних результатів, висновки і пропозиції виробництву, список використаної літератури, додатки. Роботу ілюстровано 11 рисунками і 21 таблицями. Список використаних літературних джерел містить 355 найменувань, серед яких 104 праці зарубіжних авторів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Роботу виконували протягом 2004 - 2008 рр. у лабораторії вивчення туберкульозу Національного наукового центру “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини” (ННЦ ІЕКВМ), птахівничих господарствах різних форм власності Луганської, Донецької і Херсонської областей.

Клінічним і алергічним методами досліджено на туберкульоз 2831 курей-несучок, 16 страусів, 70 цесарок, 3 павичів, 100 перепелів, які перебували в особистих підсобних господарствах громадян, спеціалізованих птахогосподарствах різного напрямку продуктивності та умов утримання, розташованих у зонах Степу і Лісостепу України, а також синантропну птицю.

Для туберкулізації птиці використовували туберкулін очищений (ППД) для птиці Курської біофабрики, серія № 6, контроль № 6, виготовлений 15.11.03. Алерген вводили внутрішньошкірно інсуліновими шприцями в дозі 0,1 см³ (2500 ТО) курам і цесаркам у ліву сережку, а перепелам, павичам і страусам в ділянці шкіри зовнішнього боку гомілки лівої кінцівки. Страусам туберкулін вводили внутрішньошкірно безголковим ін'єктором БІ - 7 у дозі 0,1 см³ (5000 ТО). Облік реакції здійснювали через 30 і 36 годин після введення алергена. Реагуючу на туберкулін птицю піддавали діагностичному забою.

Бактеріологічне дослідження патологічного матеріалу здійснювали згідно з “Настановою по діагностиці туберкульозу тварин та птиці”, затвердженою ГУВ МСГП України в 1994 році. Бактеріологічним методом досліджено 57 проб свіжого та замороженого біоматеріалу, відібраного від 41 курки, 8 голубів, 1 шпака і 7 горобців.

Передпосівну обробку патологічного матеріалу від птиці проводили за методом А.П. Алікаєвої (1954). В культурах мікобактерій першої генерації вивчали морфологічні ознаки, тинкторіальні властивості - в мазках, забарвлених за методом Ціля-Нільсена; культуральні властивості - морфологію колоній, швидкість і характер росту на яєчному живильному середовищі за температур 25°C, 37°C і 45°C; фотохромогенність - за методом G. Kubica, (1973), каталазну (З. Middlebrook, 1954) і амідазну активність (А. Taegnet et al., 1964) - в модифікації Т.Б. Ільїної (1981); реакцію з теллуридом калію (J. Kielburn et al, 1969); гідроліз Твін-80 (G. Wayne, 1962), стійкість до 5% натрію хлористого (D. Kestle, 1967), а також ріст на м'ясопептонному бульйоні.

Біологічні властивості мікобактерій, виділених з патологічного матеріалу, вивчали в дослідах на морських свинках, кролях і курах.

У процесі визначення видової належності ізольованих епізоотичних штамів мікобактерій для контролю були використані референтні штами мікобактерій *M. avium*, *M. terrae*, *M. intracellulare*, *M. triviale*, *M. nonchromogenicum*, які перебували в колекції культур лабораторії вивчення туберкульозу ННЦ “Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини”.

Виділення протеїногенного штаму здійснювали шляхом селекції з використанням дев'яти штамів *M. avium*, які добре росли на середовищі Павловського на 20 день. Для цього робили висів на яєчне середовище в розведенні від 10^{-1} до 10^{-8} . З типових колоній культуру пересівали на яєчне середовище і середовище Павловського для накопичення бактеріальної маси.

Бактеріальну масу, що виросла на середовищі Павловського, інактивували в автоклаві за температури 102°C упродовж 60 хвилин. З інактивованої бактеріальної маси виготовляли антиген для ККРА. Виготовлений антиген перевіряли на повноту інактивації, стерильність, активність, специфічність, самоаглютинацію із сироватками крові та пробами крові здорових і експериментально заражених *M. avium* курей.

У процесі виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для птиці одержані шляхом селекції культури *M. avium* висівали на синтетичне живильне середовище ЗКП – 1 і через 60 днів визначали вихід бактеріальної маси з 1 літра середовища шляхом зважування її на аналітичних вагах.

Вміст білка в культуральному фільтраті *M. avium* визначали за методом Кельдаля (1960), після цього виготовляли три мікросерії туберкуліну очищеного (ППД) для птиці. У кожній серії виготовленого алергена визначали зовнішній вигляд, однорідність, стерильність, нешкідливість, рН, вміст гліцерину, натрію хлористого, фенолу, сенсibiliзаційні властивості, специфічність та активність.

Сенсibiliзаційну властивість туберкуліну вивчали в дослідах на здорових морських свинках після трьохразового з інтервалом 5 діб та через 15 діб,

внутрішньошкірного введення в дозі $0,1 \text{ см}^3$. Облік реакції на введення туберкуліну здійснювали через 24 години після останнього введення алергена.

Специфічність кожної серії окремо визначали в дослідах на здорових морських свинках і курах, які до початку досліду не реагували на туберкулін для птиці. Кожній окремо морській свинці з лівого боку, а курці в ліву борідку вводили дослідний алерген, а з правого боку та в праву борідку - контрольний туберкулін для птиці. Облік реакції на туберкулін у морських свинок враховували через 24 години, а у курей - через 30-36 годин після введення.

Активність туберкуліну вивчали в дослідах на морських свинках, сенсibilізованих живою культурою *M. avium*. Згідно з ГОСТом 23881-79 кожне розведення (100 ТО і 500 ТО в $0,1 \text{ см}^3$) внутрішньошкірно вводили в депільовані ділянки шкіри з лівого та правого боків тіла.

Нешкідливість кожної серії туберкуліну перевіряли в дослідах на білих мишах вагою 18 – 20 г, яким підшкірно вводили $0,25 \text{ см}^3$ стерильного туберкуліну та спостерігали протягом 10-ти діб.

Біологічну активність кожної серії алергена вивчали порівняно з контрольною серією туберкуліну в дослідах на хворих туберкульозом курах. Для сенсibilізації морських свинок і зараження курей використовували виробничий штаб *M. avium* ІЕКВМ УААН.

При визначенні нешкідливості, активності та сенсibilізаційних властивостей виготовлених серій туберкуліну для контролю використовували туберкулін очищений (ППД) для птиці Курської біофабрики, серія № 6, контроль № 6, виготовлений 15.11.03.

Для ліофілізації використовували бактеріальну масу штаму *M. avium* ЗСП - 93, одержану на середовищі Павловського. Після бактеріоскопічного контролю культури на чистоту з бактеріальної маси готували суспензію, з вмістом 1, 100, 200, 300, 400 мг/см^3 захисного середовища й розливали в ампули або флакони, вміст яких піддавали заморожуванню та ліофільному висушуванню.

Після ліофільного висушування ампули запаювали, а флакони закривали гумовими пробками, здійснювали контроль ефективності ліофілізації шляхом визначення залишкової вологи у висушеній культурі, морфологічні, тинкторіальні, культуральні, біохімічні, біологічні властивості, рівень життєздатності ліофілізованих культур *M. avium* і стерильність.

Як захисні суспензійні середовища при ліофілізації використовували стерильне сахарозо-желатинозне середовище (СВ), сахарозо-желатиново-агарове середовище (СЖА), сахарозо-желатинове середовище (СЖ).

Ліофілізацію *M. avium* здійснювали на установці "ОЕ - 960" за температури конденсора -50°C та вакууму не менше 100 мм рт. ст. Через 36 годин ампули з ліофільновисушеною культурою *M. avium* запаювали під вакуумом, а флакони закривали гумовими пробками.

Залишкову вологу в ліофільно висушених культурах визначали прискореним методом шляхом висушування в сушильній шафі за атмосферного тиску 100 мм рт. ст. й температури $100 \pm 1^\circ\text{C}$ впродовж однієї години.

Вміст залишкової вологи в ліофілізованому матеріалі визначали за формулою:

$$A = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{m_1}, \text{ де}$$

A - залишкова волога препарату, в %; m_1 - початкова вага проби, в мг;
 m_2 - вага проби після висушування, в мг

Вивчення життєздатності ліофільно висушених культур *M. avium* здійснювали бактеріологічним методом шляхом висіву десятикратних розведень на яєчне живильне середовище для культивування мікобактерій з подальшим підрахунком колоній, що виростили. Ліофілізовану культуру мікобактерій вважали життєздатною, якщо характерний ріст колоній *M. avium* спостерігався в пробірках із суспензією в розведеннях від 10^{-1} до 10^{-6} .

Біологічні властивості ліофілізованого штаму *M. avium* вивчали в порівнянні з неліофілізованою культурою, у дослідах на 4 здорових кролях породи Шиншила живою масою 2-2,5 кг та 6 курах породи Леггорн живою масою 1,2-1,5 кг, які не реагували на туберкуліни для ссавців і птиці.

Статистичну обробку одержаних результатів здійснювали за методами варіаційної статистики (Лакін Г.В., 1990; Зайцев І.А., 1991; Гаркавий В.К., Ярова В.В., 2004).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вивчення епізоотичної ситуації щодо туберкульозу птиці в Україні.

Ретроспективним аналізом встановлено, що в Україні реєстрація неблагополучних пунктів щодо туберкульозу птиці велась з 1947 року, найбільшу кількість неблагополучних пунктів було виявлено у 1958 році – 1930, а найбільшу кількість хворої на туберкульоз птиці було виділено у 1962 році - 395,1 тис. гол. В подальшому в результаті здійснення оздоровчих заходів, до кінця 1972 року вдалось досягти повного оздоровлення птахогосподарств від туберкульозу птиці. З 1973 р. алергічне дослідження птиці на туберкульоз не проводилось, а контроль благополуччя здійснювався патологоанатомічним методом за планового забою птиці в кінці технологічного циклу виробничої експлуатації.

Аналізом результатів виділення *M. avium* з патологічного матеріалу, відібраного від різних видів тварин і птиці з 1970 по 2007 роки, встановлено, що з досліджених 1069827 проб, відібраних від забитої з діагностичною метою великої рогатої худоби в період з 1970 по 1997 роки, ізольовано - 961 культура *M. avium*, від свиней з 2196 проб - ізольовано 108 культур, від птиці з 70048 проб - 1664 культури.

В період з 1998 по 2007 роки із 109352 досліджених проб біоматеріалу від реагуючої на туберкулін великої рогатої худоби було виділено лише 168 культур, тоді як дані про виділення *M. avium* з біоматеріалу від свиней та птиці з 1998 року у ветеринарній звітності відсутні. Що стосується птиці, яка утримується в підсобних господарствах громадян, то епізоотична ситуація щодо туберкульозу на сьогодні залишається невивченою.

Наведені дані свідчать про те, що збудник туберкульозу птиці циркулює на поголів'ї сільськогосподарських тварин і птиці. При цьому хвора на туберкульоз птиця із секретами й екскретами виділяє в зовнішнє середовище збудника туберкульозу, який тривалий час зберігає свою життєздатність, не втрачаючи

біологічних властивостей. Забруднені збудником корми, вода, пил, потрапляючи через травний тракт і органи дихання в організм сприйнятливих тварин і птиці, зумовлюють в їх органах і тканинах характерні для туберкульозу ураження, а виділяючись в зовнішнє середовище – сприяють розвитку епізоотичного процесу.

Дослідження на туберкульоз птиці в підсобних господарствах громадян.

При дослідженні на туберкульоз птахопоголів'я 47 підсобних господарствах громадян дев'яти населених пунктів птиці з клінічними ознаками туберкульозу не виявлено.

Алергічним методом виявлено 59 реагуючих курей. При цьому кількість реагуючої птиці в окремих пунктах була неоднаковою й коливалась від 3,3 до 38 %, а в одному випадку цей показник становив 89 %. В середньому у всіх підсобних господарствах кількість реагуючої на туберкулін птиці становила 12,2 %.

Таблиця 1

Результати клінічних та алергічних досліджень на туберкульоз птиці підсобних господарств громадян

Населений пункт	Вік птиці (міс.)	Досліджено клінічно	Досліджено алергічно		
			Усього гол.	з них реагувало	
				гол.	%
1	18 - 24	99	99	5	5,1
2	24 - 30	19	19	17	89,0
3	16 - 20	50	49	-	-
4	18 - 24	47	47	7	14,9
5	18 - 24	95	94	7	7,4
6	6 - 18	39	9	3	33
7	6 - 18	93	92	3	3,3
8	12 - 18	51	51	9	17,6
9	18 - 24	21	21	8	38
Усього	6 - 30	514	481	59	12,2

Патологоанатомічним дослідженням реагуючої птиці в 29,4 % випадків виявили туберкульоз в генералізованій формі. Туберкульозні ураження в печінці спостерігали в 93,4% випадків, при цьому печінка була збільшена в 1,5 – 2 рази, мала жовто-глинистий колір, а на поверхні і в глибині тканини були вузлики сірувато-білого кольору різного розміру.

Результати алергічного дослідження птиці на туберкульоз з урахуванням вікового критерію піддавали статистичній обробці із застосуванням кореляційно-регресійного аналізу. Для характеристики зв'язку між кількістю реагуючої на туберкулін птиці і віком розраховували параметри рівняння регресії й визначали тісноту зв'язку, використовуючи коефіцієнт кореляції й детермінації.

Рівняння регресії має вигляд $Ух = -5,2 + 0,63 x$, коефіцієнт регресії $b = 0,63$, що свідчить про те, що за підвищення вікового критерію на один місяць кількість реагуючої птиці збільшується на 0,63. Так, якщо серед поголів'я птиці в

дванадцятимісячному віці кількість реагуючої становила 2,36 %, то через рік цей показник підвищиться до 9,92 %.

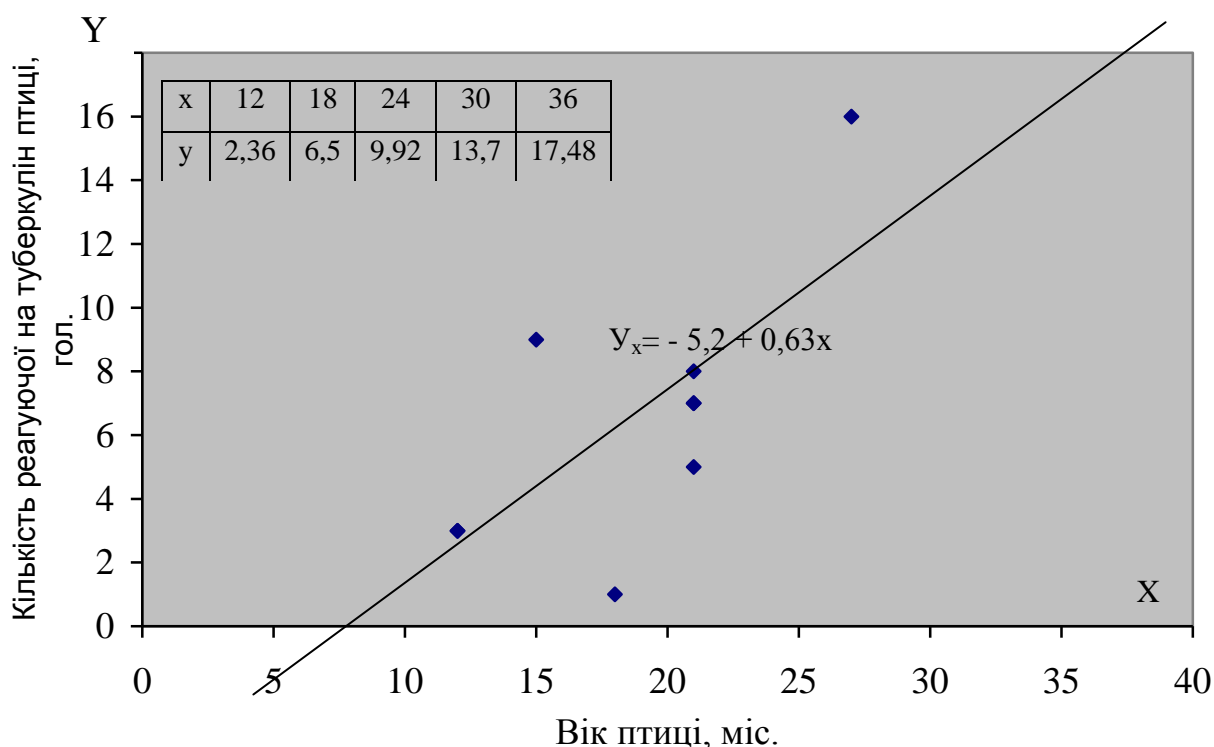


Рисунок 1. Залежність кількості реагуючої на туберкулін птиці від віку

Коефіцієнт кореляції дорівнював 0,7, що вказує на тісний зв'язок між ознаками, що вивчаються, оскільки він стоїть близько до 1.

Дослідження на туберкульоз птиці в птахогосподарствах.

Під час алергічного дослідження в спеціалізованих птахогосподарствах з досліджених 2350 курей, 16 страусів, 70 цесарок, 3 павичів і 100 перепелів було виділено 18 реагуючих курей-несучок. У товарних господарствах ПФ “Краснодон”, ПС “Перевальський” яєчного напрямку було виділено 1,77 - 2,56% реагуючих курей, а в племінному птахогосподарстві “Сімейкінське” - 0,06%. У підсобному господарстві “Донбас-агрогаз” клінічно хворої на туберкульоз та реагуючої на туберкулін птиці не виявлено.

Після забою вісімнадцяти реагуючих курей патологоанатомічні зміни, характерні для туберкульозу, були виявлені у 15, а під час здійснення післязабійної ветеринарно-санітарної експертизи в кінці технологічного циклу в органах (печінка) були виявлені зміни характерні для туберкульозу ще у 6 голів, які не реагували на внутрішньошкірне введення туберкуліну.

Для визначення джерела збудника туберкульозної інфекції в досліджуваних господарствах були відловлені 163 голуби, 6 шпаків, 243 горобці, 5 ворон і 2 ластівки та піддані патологоанатомічному дослідженню на туберкульоз. При цьому характерні для туберкульозу зміни були виявлені у 7 горобців, 1 шпака і 8 голубів.

Культуральним дослідженням 41 проби біоматеріалу було ізольовано 19 культур, які за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними й біологічними властивостями були віднесені до *M. avium*.

Результати здійснених досліджень свідчать про те, що *M. avium* циркулює на поголів'ї птиці як в індивідуальних підсобних господарствах громадян, так і в спеціалізованих птахогосподарствах та дикої й синантропної птиці. Слід зазначити, що зараження птиці *M. avium* в господарствах громадян становило 12,2 %, а в спеціалізованих птахогосподарствах - від 0,06 % до 2,27 %. Джерелом туберкульозної інфекції в цих господарствах були хворі голуби й горобці, які постійно „фуражують” у приміщеннях та контактують із сприйнятливою птицею.

Для контролю благополуччя та своєчасного виявлення інфікованої збудником туберкульозу птиці в птахогосподарствах доцільно здійснювати щорічне дослідження птиці на туберкульоз алергічним, а в разі необхідності й серологічним методами. Для здійснення цих досліджень необхідні специфічні, високочутливі діагностичні препарати. Виготовлення таких препаратів можливе за наявності штамів зі стабільними антигенними й протеїногенними властивостями, що забезпечило б одержання якісних алергенів і антигенів. Ураховуючи ці обставини, подальші дослідження ми спрямували на пошук штамів *M. avium*, перспективних для виготовлення діагностичних препаратів.

Селекція протеїногенних штамів *M. avium*.

Для виділення штамів *M. avium*, придатних для виготовлення туберкуліна та антигена, необхідно було здійснити селекцію епізоотичних культур, їх адаптацію до синтетичних живильних середовищ та вивчити протеїногенні й антигенні властивості.

Виділення протеїногенного штаму здійснювали шляхом селекції з використанням дев'яти штамів *M. avium*, які добре росли на середовищі Павловського на 20 день. Для цього робили завись *M. avium* на стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду в концентрації 1 мг/см³ та робили вісім послідовних розведень, які висівали на яєчне середовище й культивували в термостаті за 37,5 °С упродовж 30 днів. Усього було проведено п'ять послідовних пасажів.

Усі культури від першого до п'ятого розведень на 10-16 день добре росли в S-формі у вигляді світло-сірих гладеньких, блискучих, маслянистої консистенції колоній, розташованих по всій поверхні середовища. У шостому - сьомому розведеннях у ці ж терміни на поживному середовищі виростили від 10 до 50 окремих колоній, а у восьмому розведенні – лише поодинокі колонії. За подальших пасажів змін у характері росту колоній не спостерігали. Після п'ятого пасажу відбирали окремі колонії з найбільш характерними для *M. avium* культуральними ознаками і висівали на середовище Павловського для накопичення бактеріальної маси. Через 20 днів культивування у отриманих шляхом селекції штамів *M. avium* вивчали морфологічні, тинкторіальні, культуральні, біохімічні, біологічні та протеїногенні властивості. За результатами здійснених досліджень були відібрані штами *M. avium* №№ 6, 80, 92 і 93 як перспективні для виготовлення діагностичних препаратів.

Адаптація селекціонованих штамів *M. avium* до синтетичних живильних середовищ та вивчення їх протеїногенних властивостей.

Для визначення протеїногенних властивостей отримані шляхом селекції штами *M. avium* адаптували до синтетичного живильного середовища.

Адаптацію культур здійснювали шляхом дворазового послідовного висіву у флакони з синтетичним середовищем та подальшим висівом отриманої матричної розплідки кожного штаму в 1 літрі цього середовища і культивували в трилітрових бутлях в термостаті за температури 37°C впродовж 60 діб.

Таблиця 2

Інтенсивність росту, накопичення бактеріальної маси та загального білка у штамів виду *M. avium* на середовищі ЗКП - 1

Штами	Інтенсивність росту при пасажах		Вихід бактеріальної маси, %		Вміст загального білка, мг/см ³	
	I	II	I	II	I	II
<i>M. avium</i> № 92	+++	++++	0,23 ± 0,02	0,51 ± 0,02	1,40 ± 0,13	1,9 ± 0,05
<i>M. avium</i> № 93	+++	++++	0,31 ± 0,01	0,54 ± 0,06	3,20 ± 0,32	3,42 ± 0,01
<i>M. avium</i> № 80	++	+++	0,28 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,60 ± 0,10
<i>M. avium</i> № 6	++	+++	0,16 ± 0,01	0,28 ± 0,05	0,23 ± 0,02	0,40 ± 0,13

Примітка: ++ - розмір плівки на поверхні середовища становить 20 – 50%; +++ - розмір плівки на поверхні середовища становить 50 – 80%; ++++ - уся поверхня середовища покрита зморшкуватою плівкою; I, II – номери пасажів

Дослідженням встановлено, що не всі культури за першого пасажу добре адаптувалися до синтетичного середовища: накопичення бактеріальної маси становило від 0,16 ± 0,01 % до 0,31 ± 0,01 %, а вміст білка в культуральному фільтраті - від 0,23 ± 0,02 мг/см³ до 3,20 ± 0,32 мг/см³; за другого пасажу інтенсивність росту культур на синтетичному середовищі та накопичення бактеріальної маси були кращими і складала відповідно – від 0,28 ± 0,05 % до 0,54 ± 0,06 %, а вміст білка в культуральному фільтраті – від 0,40 ± 0,13 мг/см³ до 3,42 ± 0,01 мг/см³. Так як у фільтратах штаму *M. avium* № 92 вміст білка склав 1,9 ± 0,05 мг/см³ і штаму *M. avium* № 93 відповідно 3,42 ± 0,01 мг/см³, їх відібрали для подальшої роботи. З культурального фільтрату кожного окремо штаму *M. avium* (№№ 92, 93) були виготовлені дослідні мікросерії туберкуліну очищеного (ППД) для птиці і в дослідях на лабораторних тваринах визначена їх стерильність, нешкідливість, сенсibiliзаційні властивості, наявність життєздатних клітин та активність. За результатами здійснених досліджень встановлено, що виготовлені мікросерії туберкуліну з штамів *M. avium* №№ 92 і 93 були стерильними, нешкідливими і не мали сенсibiliзаційних властивостей.

Біологічна активність туберкуліну, виготовленого з штаму *M. avium* № 92, становила 40894 ТО, а штаму *M. avium* № 93 – 50495 ТО. Отримана шляхом селекції культура *M. avium* № 93 мала високі протеїногенні властивості і була зареєстрована як штам *M. avium* – ЗСП – 93 та задепонована в Депозитарії ДНКІБШМ як протеїногенний штам, придатний для виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для птиці.

Виготовлення антигена з *M. avium* для ККРА.

Для виявлення анергічної до туберкуліну птиці використовують серологічні методи дослідження із застосуванням високоспецифічних антигенів. Для отримання таких антигенів необхідно було відібрати штам *M. avium* і розробити методику виготовлення антигена для постановки реакції.

Для одержання антигена з інактивованої бактеріальної маси штамів *M. avium* ІЕКВМ УААН і *M. avium* ЗСП-93, вирощених на середовищі Павловського, готували суспензію в концентраціях 1 мг/см³ і 5 мг/см³ бактеріальних клітин у 0,2 % стерильному формалінізованому ізотонічному розчині натрію хлористого з 0,4 % лимоннокислого натрію і 0,03 % малахітового зеленого (1 варіант). Другий варіант антигена готували з інактивованої бактеріальної маси вказаних штамів, яку піддавали ультразвуковій дезінтеграції протягом 30 хвилин з подальшим центрифугуванням за 3000 об/хв. Отриману надосадкову рідину використовували як антиген.

Біологічну активність і специфічність виготовлених антигенів визначали в ККРА з позитивними й негативними сироватками крові та з пробами крові від здорових і експериментально заражених *M. avium* курей.

Таблиця 3

Визначення біологічної активності антигенів в СКРА і ККРА

№ з/п	Досліджуваний матеріал	Реагувало гол. з антигенами		
		Корпускулярний		УЗДН
		1 мг/см ³	5 мг/см ³	5 мг/см ³
Антиген з <i>M. avium</i> ІЕКВМ УААН				
1	Кров хворих курей (n=6)	4	6	2
2	Сироватка позитивна (n=3)	2	3	1
3	Кров здорових курей (n=5)	-	-	-
4	Сироватка негативна (n=3)	-	-	-
5	Ізотонічний розчин NaCl	-	-	-
Антиген з <i>M. avium</i> ЗСП - 93				
1	Кров хворих курей (n=6)	3	6	1
2	Сироватка позитивна (n=3)	2	3	1
3	Кров здорових курей (n=5)	-	-	-
4	Сироватка негативна (n=3)	-	-	-
5	Ізотонічний розчин NaCl	-	-	-

Дослідження показали, що найбільшу активність мав антиген, який містив 5 мг/см³ цілісних бактеріальних клітин, а антиген, що містив 1 мг/см³ цілісних

клітин та отриманий із зруйнованих ультразвуком бактеріальних клітин у СКРА і ККРА, були менш активними. Це дало підставу вважати, що антиген із цілісних бактеріальних клітин (5 мг/см^3) може бути використаний для прижиттєвої діагностики туберкульозу птиці. Для вивчення терміну його придатності, було виготовлено по три мікросерії антигенів окремо із штамів *M. avium* ІЕКВМ УААН і *M. avium* ЗСП - 93, які зберігали в умовах холодильника за температури $+4^\circ\text{C}$.

Активність антигенів визначали впродовж восьми місяців в ККРА з пробами крові від хворих на туберкульоз курей. Встановлено, що активність антигенів протягом шести місяців була стабільною, а через сім - вісім місяців дещо зменшувалася.

Для підтвердження отриманих результатів було проведено міжлабораторне (доклінічне) комісійне випробування антигенів на активність, специфічність у дослідах на здорових курах (5 гол.) і внутрішньовенно заражених у дозах 1, 0,1 і $0,01 \text{ мг/см}^3$ живою культурою *M. avium* ІЕКВМ УААН (I, II, III групи по 5 гол.). Через 15, 30 і 42 доби після початку досліду курей досліджували алергічним методом і шляхом постановки ККРА.

На 15 день після зараження в першій групі реагувало на туберкулін дві курки і в ККРА - три курки, в другій групі реагувала на туберкулін і в ККРА одна курка, а в третій групі – реагуючих не виявлено. На 30 день після зараження кури першої, другої та третьої груп реагували на туберкулін і в ККРА. На 42 день після початку досліду всі кури дослідних груп реагували в ККРА, тоді як на туберкулін реагували дві з трьох курей першої групи, всі кури другої групи і чотири з п'яти – третьої групи. Кури контрольної групи протягом досліду не реагували на туберкулін (ППД) для птиці та в ККРА.

Патологоанатомічним дослідженням у забитих в кінці експерименту курей була встановлена генералізована форма туберкульозу, а при бактеріологічному дослідженні виділена культура *M. avium*.

Результати доклінічних випробувань дозволили зробити висновок, що антигени, виготовлені з *M. avium* ІЕКВМ і *M. avium* ЗСП-93, є активними, специфічними і дозволяють виявляти інфікованих туберкульозом курей в ККРА та можуть бути використані для прижиттєвої діагностики туберкульозу птиці, що й стало підставою для розробки нормативної документації (ТУ, інструкції) та проведення виробничого (післяклінічного) комісійного випробування.

Згідно з проектом інструкції і ТУ були виготовлені три дослідні серії антигенів з кожного окремо штаму *M. avium* ІЕКВМ УААН і *M. avium* ЗСП – 93. В кожній серії антигенів визначали зовнішній вигляд, наявність механічних домішок, герметичність закупорки флаконів, стерильність, рН, повноту інактивації, активність і специфічність.

Проведеними комісійними дослідженнями встановлено, що виготовлені антигени являли собою суспензію світлого зелено-синього кольору, без механічних домішок, осад після струшування рівномірно розбивався, флакони були герметично закупорені, рН складала 7,7, не містили життєздатних клітин, були стерильними, специфічними та активними.

Антигени вважали активними, якщо вони давали позитивний результат в СКРА з позитивною сироваткою крові в розведенні не менше, ніж 1:2.

Результати комісійного міжвідомчого виробничого (післяклінічного) випробування дозволили комісії зробити висновок, що виготовлені зі штамів *M. avium* ІЕКВМ УААН і *M. avium* ЗСП - 93 антигени відповідають вимогам проекту ТУ й інструкції і можуть бути застосовані в ККРА для діагностики туберкульозу птиці, а нормативна документація затверджена в установленому порядку.

Підбір захисно-суспензійних поживних середовищ і оптимізація умов ліофілізації *M. avium*.

Для отримання високоактивних діагностичних препаратів (антигенів і алергенів) необхідно мати штами мікобактерій із стабільними біологічними властивостями. Підтримка штамів на живильних середовищах шляхом багаторазових пересівів може призвести до зменшення протеїногенних і антигенних властивостей у штамів-продуцентів. На сьогодні ефективним методом консервування є ліофілізація, що стосується захисних поживних середовищ і режимів ліофільного висушування для *M. avium*, то вони не з'ясовані і потребують вивчення, тому наша робота була спрямована на підбір захисно-суспензійних живильних середовищ і оптимізації умов ліофілізації *M. avium*.

Експериментальному висушуванню піддали 15-30 - добову культуру *M. avium*, вирощену на середовищі Павловського, з якої готували завись бактеріальних клітин у захисно-суспензійних середовищах (СЖ, СЖА і СВ) в концентраціях 1, 100, 200, 300 і 400 мг/см³.

Отриману суспензію кожного розведення в захисно-суспензійному середовищі піддавали ліофілізації за двох режимів: перший – заморожування за - 30 °С впродовж 24 годин і другий – заморожування за - 50 °С впродовж 12 годин і сублимаційного висушування за 18-24 °С.

Визначали кількість життєздатних клітин *M. avium* після ліофілізації та під час зберігання впродовж 1 - 18 місяців в умовах холодильника за температури +4 °С.

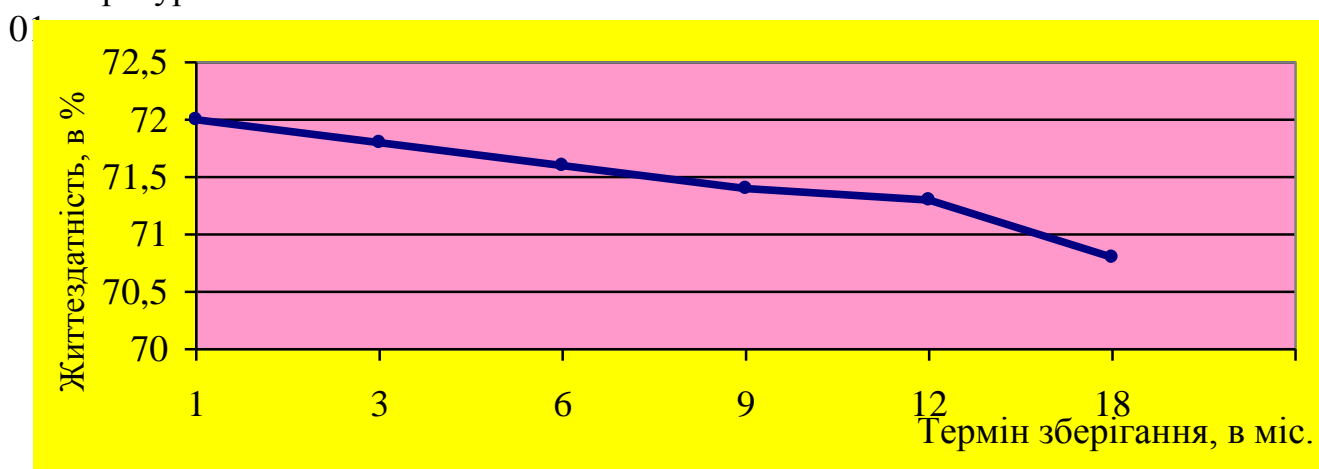


Рисунок 2. Життєздатність ліофілізованої культури *M. avium* ЗСП - 93 за зберігання протягом 18 місяців

Вихід найбільшої кількості життєздатних клітин *M. avium* спостерігали за другого режиму з концентрацією бактеріальної маси 100 - 200 мг/см³ захисно-суспензійного середовища висушування СВ, до складу якого входить 10 % сахарози, 2 % желатинози на ізотонічному розчині натрію хлористого, що забезпечило життєздатність ліофілізованих клітин на рівні 70 – 72 %.

Для підтвердження отриманих результатів і порівняння початкових властивостей у ліофільно висушеній культурі *M. avium* необхідно було вивчити морфологічні, тинкторіальні, біохімічні, культуральні та біологічні властивості.

З цією метою штам *M. avium* ЗСП - 93 в концентрації бактеріальної маси 200 мг/см³ в захисно-суспензійному середовищі СВ піддали ліофілізації за оптимального режиму: заморожування за - 50 °С впродовж 12 годин і подальшого ліофільного висушування за 18 – 24 °С впродовж 32 годин.

Вивчення морфологічних, тинкторіальних, культуральних, біохімічних і біологічних властивостей здійснювали на поживних середовищах і лабораторних тваринах. Для цього ліофілізований штам реактивували в стерильному ізотонічному розчині натрію хлористого в розведенні 1:2. Встановлено, що ліофілізована культура *M. avium* за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними й біологічними властивостями не відрізнялася від початкової культури. Під час вивчення біологічних властивостей у дослідах на експериментально заражених морських свинках, курах і кролях ліофілізований і нативний штами за підшкірного введення морським свинкам впродовж 90 днів не викликали в органах і тканинах уражень, характерних для туберкульозу, а у заражених внутрішньовенно кролів - обумовлювали загибель від септичної форми туберкульозу впродовж 16 – 28 діб та загибель курей від туберкульозу впродовж 31 - 65 діб.

ВИСНОВКИ

1. У дисертації наведені аналітичні дані щодо епізоотичної ситуації туберкульозу птиці в господарствах різних форм власності і виділених культур *M. avium* з біоматеріалу від сільськогосподарських тварин. Проведене вивчення епізоотичних штамів *M. avium* - морфологічних ознак, культуральних, біохімічних, біологічних властивостей. Шляхом селекції одержано протеїногенний штам *M. avium*, придатний для виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для птиці. Розроблена методика виготовлення антигену для ККРА, а також режим ліофілізації *M. avium* на захисному суспензійному середовищі, що забезпечує їх життєздатність на рівні 70 - 72%.

2. Ретроспективним аналізом державної звітності встановлено, що в період з 1970 до 2007 рр. з досліджуваного на туберкульоз біоматеріалу ізольовано 2898 культур *M. avium*, в т.ч. від великої рогатої худоби – 38,9 %, від свиней - 3,7 % та від птиці - 57,4 %.

3. Методом алергічних досліджень птахопоголів'я, що утримується в індивідуальних господарствах громадян, відсоток реагуючих на внутрішньошкірну пробу складає від 3,3 % до 38 %, тоді як в птахопідприємствах - коливається від 0,06 % до 2,56 %.

4. Селекціонований туберкуліногенний штам *M. avium* ЗСП - 93, має високі протеїногенні властивості, що дозволяє використовувати його для виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для птиці.

5. Отриманий шляхом селекції штам *M. avium* ЗСП - 93, за умови культивування на синтетичному поживному середовищі впродовж 60 діб, забезпечує накопичення з розрахунку на 1 літр бактеріальної маси $0,54 \pm 0,06$ %, а в культуральному фільтраті - вмісту загального білка $3,42 \pm 0,01$ мг/см³ і біологічну активність виготовленого з нього туберкуліну – 50495 ТО.

6. Встановлена висока активність в ККРА корпускулярного антигену з штаму *M. avium* ІЕКВМ УААН і селекціонованого штаму *M. avium* ЗСП - 93 (в концентрації 5 мг/см³).

7. Розроблена методика ліофільної сушки в концентрації 100 – 200 мг/см³ мікробних клітин у середовищі СВ дозволяє забезпечити життєздатність *M. avium* на рівні 70 - 72 % впродовж 1,5 р. (термін спостереження) без суттєвих змін морфологічних ознак, культуральних, біохімічних і біологічних властивостей, що дозволяє забезпечити бактеріальною масою процес виробництва діагностичних препаратів з *M. avium*.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для забезпечення моніторингових досліджень щодо туберкульозу птиці засобами специфічної діагностики з урахуванням результатів досліджень птиці на туберкульоз в птахогосподарствах з різною формою власності нами запропоновано:

1. Використовувати для виготовлення туберкуліну (ППД) для птиці та антигена для постановки ККРА виділений шляхом селекції протеїногенний штам *M. avium* ЗСП - № 93 (задепонований в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів № 378 від 14.07.2006).

2. Для прижиттєвої діагностики туберкульозу птиці, а також визначення ступеня інфікованості та контролю результативності оздоровчих заходів щодо туберкульозу птиці проводити постановку ККРА з антигеном виготовленим за розробленою нами методикою (розглянута і схваленої методичною комісією з інфекційної патології ННЦ “ІЕКВМ УААН” протокол № 2 від 15.03.07 р., реєстраційне посвідчення № 3908-14-0406-08 від 02.12.08 р.

3. При виготовленні та проведенні контролю якості “Антигену для діагностики туберкульозу птиці в крові-краплинній реакції аглютинації” користуватися технічними умовами – ТУ У 24.4-00497087-075:2009, які затверджені Державним науково-контрольним інститутом біотехнології і штамів мікроорганізмів та Державним комітетом ветеринарної медицини.

4. Рекомендації з ліофілізації мікобактерій пташиного виду”, які розглянуті методичною комісією з інфекційної патології ННЦ “ІЕКВМ УААН” 2 листопада 2006 року, протокол № 6, і затверджені науково-методичною радою Державного департаменту ветеринарної медицини України, протокол № 3 від 20.12.2006 року.

5. В зв'язку з тим, що при алергічному дослідженні найбільшу кількість реагуючої на туберкулін птиці спостерігали серед птахопоголів'я підсобних господарств громадян – 12,2% та статистично доведено, що загальна кількість реагуючої на туберкулін птиці обумовлена віковим критерієм, рекомендуємо проводити дослідження на туберкульоз птиці приватного сектора віком старше року один раз на рік, що і було використано при розробці “Інструкції з профілактики та ліквідації туберкульозу птиці”, затвердженої наказом Державного департаменту ветеринарної медицини України № 64 від 28.08.2006 року.

6. Основні теоретичні положення і результати експериментальних досліджень використовувати в навчальному процесі в програмі лекційного курсу та лабораторно-практичних занять при викладенні дисциплін “Мікробіологія” і “Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин” студентам і магістрантам ветеринарної медицини вищих навчальних закладів.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Алексеева, Н.В.** Проблема туберкулеза сельскохозяйственной птицы в личных подсобных хозяйствах [Текст] / Н.В. Алексеева // Зб. наук. праць Луганського нац. аграрн. ун-ту. – Луганськ, 2005. - № 50/73: Ветеринарні науки. - С. 7-18.

2. Туберкулез птиц [Текст] / А.И. Завгородний, С.А. Позмогова, В.П. Заболотная, **Н.В. Алексеева** // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2005.- Вип. 85. - С. 440 – 444. *(Дисертантка здійснювала експериментальні дослідження та взяла участь в узагальненні й оформленні матеріалів).*

3. Корреляционно-регрессионный анализ результатов аллергического исследования птицы на туберкулез [Текст] / А.И. Завгородний, А.И. Сосницкий, В.П. Заболотная, **Н.В. Алексеева** // Зб. наук. праць Харківської держ. зоовет. академії. – Х., 2006.- Вип. 13 (38): Ветеринарні науки. - С. 187-193. *(Дисертантка здійснила клінічні, алергічні, патологоанатомічні, бактеріологічні дослідження, статистичну обробку, аналіз, узагальнення одержаних результатів та підготувала статтю до друку).*

4. Завгородний А.И. Туберкулез птиц [Текст] / А.И. Завгородний, Н.В. Калашник, **Н.В. Алексеева** // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2006. - Вип. 87. - С. 337-344. *(Дисертантка здійснила виділення культур M. avium з патологічного матеріалу від птиці й різних об'єктів довкілля та проаналізувала одержані результати).*

5. Природная очаговость туберкулеза птиц [Текст] / А.И. Завгородний, С.А. Позмогова, В.П. Заболотная, **Н.В. Алексеева** // Вісник Сумського нац. аграрн. ун-ту. Сер.: Ветеринарна медицина. – 2006. – Вип. 1-2 (15-16). – С. 71-74. *(Дисертантка брала участь у здійсненні алергічного дослідження на туберкульоз свиней та птиці, проаналізувала та узагальнила одержані результати).*

6. Сосницкий О.И. Епизоотологический мониторинг туберкулеза птиц [Текст] / О.И. Сосницкий, В.П. Заболотная, **Н.В. Алексеева** // Наук. вісник Львівської нац. академії. Сер.: Ветеринарна медицина. – Львів, 2006. – Вип. 3 (30).

– С. 157-161. *(Дисертантка здійснила епізоотологічний моніторинг щодо туберкульозу птиці в індивідуальних господарствах громадян і великих спеціалізованих птахогосподарствах, узагальнила отримані результати та підготувала статтю до друку).*

7. Туберкулез в птицеводстве [Текст] / А.И. Завгородний, Н.В. Калашник, С.А. Позмогова, **Н.В. Алексеева** // Птахівництво: міжвід. темат. зб. – Х., 2006.- Вип.- 58. - С. 110–114. *(Дисертантка брала участь у дослідженні на туберкульоз свійської й синантропної птиці в птахогосподарствах з різною формою власності та аналізі й узагальненні одержаних результатів).*

8. **Алексеева, Н.В.** Эпизоотологический мониторинг туберкулеза птиц в птицеводствах различного направления продуктивности [Текст] / Н.В. Алексеева // Зб. наук. праць Луганського нац. аграрн. ун-ту. – Луганськ, 2006. - № 63/86 : Ветеринарні науки. - С. 20-26.

9. Завгородний А.И. Туберкулез птиц [Текст] / А.И. Завгородний, Н.В. Калашник, **Н.В. Алексеева** // Вісник Сумського нац. аграрн. ун-ту. Сер.: Ветеринарна медицина. – 2006. – Вип. 7 (17). – С. 46-50. *(Дисертантка здійснювала дослідження з вивчення властивостей виділених з патологічного матеріалу від птиці й різних об'єктів довкілля та культур М. avium і взяла участь в узагальненні й оформленні матеріалів).*

10. Роль микобактерий комплекса М. avium-intracellulare в патологии животных и человека [Текст] / А.И. Завгородний, О.В. Шаповалова, С.А. Позмогова, **Н.В. Алексеева** // Зб. наук. праць Луганського нац. аграрн. ун-ту. – Луганськ, 2007. - № 78 (101): Ветеринарні науки. - С. 206-212. *(Дисертантка здійснила ретроспективний аналіз щодо виділення М. avium з біоматеріалу від сільськогосподарських тварин і птиці та аналіз одержаного матеріалу).*

11. **Алексеева, Н.В.** Культуральные свойства изолированных культур М. avium [Текст] / Н.В. Алексеева // Вісник Держ. агрокол. ун-ту: наук.-метод. зб. - Житомир, 2007 – № 2 (19).-Т.1. – С. 67-71.

12. Оптимизация условий лиофилизации культур Mycobacterium avium [Текст] / А.И. Завгородний, **Н.В. Алексеева**, А.И. Сосницький, С.А. Позмогова // Зб. наук. праць Луганського нац. аграрн. ун-ту. – Луганськ, 2008. - № 84: Ветеринарні науки. - С. 44-46. *(Дисертантка здійснювала експериментальні дослідження щодо впливу процесу ліофілізації на культурально-морфологічні, біохімічні, біологічні властивості виділених культур М. avium і взяла участь в аналізі, узагальненні одержаних результатів та підготувала матеріали до друку).*

Алексеева Н.В. Розробка та удосконалення засобів специфічної діагностики туберкульозу птиці. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 - ветеринарна мікробіологія та вірусологія. Одеський державний аграрний університет, Одеса, 2009.

Дисертація присвячена вивченню епізоотичної ситуації щодо туберкульозу птиці та виділенню М. avium з патологічного матеріалу від сільськогосподарських тварин та птиці за період з 1970 по 2007 роки. Установлено захворювання птиці

на туберкульоз (збудник *M. avium*) у спеціалізованих птахогосподарствах різної форми власності від 0,06 % до 2,56 %, а в особистих підсобних господарствах громадян - від 3,3 до 30 % та в одному випадку до 89 %.

У ізольованих культур *M. avium* вивчено морфологічні ознаки, тинкторіальні, культуральні, біохімічні і біологічні властивості та задепоновано протеїногенний штам *M. avium* ЗСП – 93, перспективний для виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для птиці. Розроблена методика отримання специфічного антигена з *M. avium* і вивчена його ефективність в ККРА для виявлення інфікованої й хворої на туберкульоз птиці.

Крім цього, запропонована схема ліофілізації *M. avium* у захисно-суспензійному середовищі та визначена вихідна концентрація бактеріальної суспензії *M. avium* за ліофілізації. Вивчено вплив процесу ліофілізації на біологічні властивості *M. avium* та рівень життєздатності, як після ліофілізації, так і впродовж зберігання.

Одержані результати використані в процесі розробки методичних рекомендацій щодо ліофілізації мікобактерій *M. avium* та під час оформлення нормативних документів (ТУ У, інструкції) на виготовлення антигена для діагностики туберкульозу птиці в ККРА.

Ключові слова: туберкульоз птиці, епізоотичні штами, ізоляція, алергічна й серологічна діагностика, антиген для ККРА, зберігання *M. avium*, схема ліофілізації.

Алексеева Н.В. Разработка и усовершенствование средств специфической диагностики туберкулеза птицы. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 - ветеринарная микробиология и вирусология. Одесский государственный аграрный университет, Одесса, 2009.

Диссертация посвящена изучению эпизоотической ситуации по туберкулезу птицы и выделению возбудителя туберкулеза *M. avium* из патологического материала от сельскохозяйственных животных и птицы в период с 1970 по 2007 годы. Так, при культуральном исследовании 1252233 проб биоматериала было выделено 2898 культур *M. avium*, в том числе от крупного рогатого скота – 38,9 %, от свиней - 3,7 % и от птицы - 57,4 %.

Проведенными аллергическими исследованиями птицепоголовья в 2004-2008 годах установлено, что возбудитель туберкулеза *M. avium* циркулирует среди птицы в крупных специализированных птицеводствах разной формы собственности от 0,06 % до 2,56 %, личных подсобных хозяйствах граждан - от 3,3-30 % и в отдельных случаях до 89%, а также среди синантропной и дикой птицы, которая фуражирует на территории этих хозяйств.

Культуральным методом исследовано 57 проб биоматериала, отобранного от 41 курицы, 8 голубей, 7 воробьев и скворца, изолировано 19 культур *M. avium*. У выделенных культур *M. avium* изучены тинкториальные, культурально-морфологические, биохимические, биологические, протеиногенные и антигенные свойства и выделен путем селекции протеиногенный штамм *M. avium* ЗСП - 93 перспективный для изготовления туберкулина очищенного (ППД) для птицы в

стандартном растворе и антигена для постановки ККРА. Штамм задепонирован в ГНКИБШМ.

Разработана методика получения специфического антигена из *M. avium*, изучена его диагностическая эффективность в ККРА на здоровой и больной туберкулезом птице.

В диссертационной работе предложена схема лиофилизации *M. avium*, проведен подбор защитно-суспензионной среды и определена оптимальная концентрация бактериальной суспензии *M. avium* для лиофилизации. Изучено влияние процесса лиофилизации на основные биологические свойства *M. avium*, уровень жизнеспособности после процесса лиофилизации и при хранении.

Полученные результаты использованы при разработке методических рекомендаций по лиофилизации микобактерий *M. avium* и при оформлении нормативных документов (ТУ У 24.4-00497087–075:2009, инструкции) на изготовление антигена для диагностики туберкулеза птицы в ККРА.

Ключевые слова: туберкулез птицы, эпизоотические штаммы, изоляция, аллергическая и серологическая диагностика, антиген для ККРА, схема лиофилизации *M. avium*.

Aleksyeyeva N.V. Development and improvement of facilities of specific diagnostics of tuberculosis of bird. - Manuscript.

Dissertation on the competition of scientific degree of the candidate of veterinary sciences after speciality 16.00.03 - veterinary microbiology and virology. Odessa state agrarian university, Odessa, 2009.

The dissertation is devoted the study of epizootic situation in relation to the disease of bird on tuberculosis and selection of exciter of tuberculosis *M. avium* from pathological material from agricultural animals and bird for period from 1970 to 2007. The degree of distribution of tuberculosis of bird is set: in specialized different pattern of ownership from 0,06 % to 2,56 %, and in the personal subsidiary economies of citizens from 3,3 to 89 %.

At the isolated cultures of *M. avium* it is studied morphological, biochemical, biological and antigen properties and the selected culture of ZSP - 93 perspective for making of tuberculin cleared (PPD) for a bird. The method of receipt specific an antigen is developed from *M. avium* and his efficiency is studied in ККРА for the exposure of the bird infected and consumptive.

At dissertation work the chart of storage offered *M. avium* with the use of method liophilization, the selection of protective-suspensions environment is conducted and the initial concentration of bacterial suspensions of is certain. *M. avium* for liophilization. Influence of process of liophilization is studied on basic biological properties of *M. avium* but a level of maintenance of viability is both on the stages of liophilization process and during their storage.

Results are got used for development of recommendations in relation to liophilization of *M. avium* but at designed normative documents on making an antigen for to diagnostics of tuberculosis of bird in ККРА.

Key words: tuberculosis of bird, distribution, epizootic cultures, isolation, allergic and serum diagnostics, antigen, storage of *M. avium*, chart of liophilization.