

КУЛІШЕНКО ОЛЕГ МИКОЛАЙОВИЧ

УДК 619:616:98:579.873.21:636.2

**ОЦІНКА БАКТЕРІОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДІАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЬОЗУ**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,
інфекційні хвороби та імунологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Дніпропетровському державному аграрному університеті
Міністерства аграрної політики України.

Науковий керівник: доктор ветеринарних наук, професор,
Ткаченко Олексій Андрійович,
Дніпропетровський державний аграрний університет,
завідувач кафедри епізоотології та інфекційних
хвороб

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук,
Кочмарський Віктор Андрійович,
Харківська державна зооветеринарна академія,
професор кафедри епізоотології та ветеринарного
менеджменту

доктор ветеринарних наук,
член Нью-Йоркської академії наук,
Рухляда Валентин Васильович,
Білоцерківський національний аграрний університет,
завідувач кафедри мікробіології і вірусології

Захист відбудеться «__» _____ 2010 р. о __ годині 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 306.

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

Авотреферат розісланий «__» _____ 2010 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
кандидат ветеринарних наук, доцент

С.І. Масленікова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Основними причинами довготривалого неблагополуччя окремих регіонів та господарств України з туберкульозу є не тільки незадовільне виконання спеціальних організаційно-господарських й ветеринарно-санітарних протитуберкульозних заходів, а й відсутність достеменних знань щодо біології збудника, зокрема його можливостей конверсії й реверсії L-форми та значення цих форм в інфекційному та епізоотичному процесах (Кассіч Ю., Завгородній А., 2002; Ситник В., 2003; Ткаченко О.А., 2004, 2005, 2007).

У зв'язку з цим, якість лабораторної діагностики суттєво впливає на ефективність заходів з профілактики та оздоровлення тваринництва від туберкульозу. Бактеріологічні методи, які нині використовуються для діагностики цієї хвороби (бактеріоскопічний, культуральний, біологічний) як у ветеринарній так і у гуманній медицині, мають низку недоліків (Буряк Є.І., 2006; Дяченко Г., 2006). Результати бактеріологічного дослідження на туберкульоз багато у чому залежать від обраного методу передпосівної обробки біологічного матеріалу, від збалансованості живильного середовища за поживними речовинами (Кочмарський В.А., 1997, 2003; Ткаченко О.А., 1998; Боганец Н.С., 2006). Живильних середовищ нараховується велика кількість, що обґрунтовує необхідність оцінки та удосконалення окремих з них.

Останнім часом з'явилися повідомлення про можливість використання речовин гумінового походження для покращення методів бактеріологічної діагностики туберкульозу (Нуратинов Р.А., 2004; Павлов Н.Г., 2006), так як про вплив гумінових речовин на інтенсивність розмноження мікобактерій та зміну їх ліпідного складу під дією цієї речовини, у вітчизняних публікаціях практично не повідомляється.

Тому обрана тема дослідження потребує поглибленого вивчення та аналізу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є розділом теми науково-дослідної роботи кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпропетровського державного аграрного університету „Вивчення епізоотології та інфекційного процесу туберкульозу, мікобактеріозної інфекції великої рогатої худоби та вдосконалення методів діагностики” та „Розробка системи профілактики та боротьби з туберкульозом тварин, викликаного епізоотичним швидкорослим штамом *M. bovis*”, № державної реєстрації 0106 V 009573.

Мета та завдання роботи.

Метою досліджень було удосконалення бактеріологічного методу діагностики туберкульозу.

Для досягнення мети, поставлені завдання, до яких входило:

- вивчення епізоотичної ситуації щодо туберкульозу великої рогатої худоби у Дніпропетровській області (2000-2007 рр.) та вивчення ефективності традиційного бактеріологічного методу діагностики туберкульозу;

- виділення епізоотичних штамів мікобактерій та атипових мікобактерій з біологічного матеріалу від великої рогатої худоби з неблагополучних та благополучних щодо туберкульозу господарств та вивчення їх біологічних властивостей;

- порівняння ефективності методів передпосівної обробки біологічного матеріалу та живильного середовища для культивування мікобактерій;

- виготовлення та апробація експериментальних варіантів удосконаленого щільного живильного середовища з додаванням гідрогумату для культивування мікобактерій;

- дослідження ефективності застосування удосконаленого живильного середовища у комплексі лабораторних досліджень;

- вивчення впливу гідрогумату на ліпідний склад штамів мікобактерій.

Об'єкти дослідження: епізоотичні та музейні штами *M. bovis* та атипові мікобактерії.

Предмети дослідження: збудники туберкульозу та атипові мікобактерії, визначення культуральних, біохімічних, вірулентних, сенсibiliзуючих властивостей мікобактерій; гідрогумат та ліпіди мікобактерій.

Методи дослідження: бактеріологічний, патологоанатомічний, алергічний, біохімічний, біологічний; тонкошарова та газорідина хроматографія (для вивчення ліпідного складу мікобактерій); статистичний (для обчислення та статистичної обробки одержаних результатів досліджень за допомогою Microsoft Office Excel 2003) та методикою Плохинского Н.А., 1970.

Наукова новизна одержаних результатів.

Встановлено, що найбільш ефективним методом є метод ферментативного збагачення біологічного матеріалу при підготовки суспензії до посіву.

Впровадження запропонованого живильного середовища для культивування мікобактерій, яке містить у своєму складі 0,125 % розчин гідрогумату, сприятиме підвищенню ефективності бактеріологічної діагностики туберкульозу.

Вперше в Україні проведено дослідження ліпідного складу штамів мікобактерій, вирощених на щільному середовищі з додаванням 0,125% розчину гідрогумату. Встановлено, що гідрогумат у складі живильного середовища для культивування мікобактерій діє як адаптоген і сприяє росту на щільному яєчному середовищі за рахунок зменшення вмісту ненасичених жирних кислот та збільшення вмісту насичених жирних кислот.

Новизна розробки підтверджена патентом України № 28293 на корисну модель «Живильне середовище для культивування мікобактерій».

Практичне значення одержаних результатів. Запропоноване живильне середовище може бути використано в практиці бактеріологічної діагностики туберкульозу. Методика виготовлення та застосування удосконаленого живильного середовища з гідрогуматом увійшла до посібника з лабораторної діагностики туберкульозу тварин, який затверджений та прийнятий до впровадження у практику ветеринарної медицини Державним комітетом ветеринарної медицини України (протокол №1 від 23-24.12.2009 року) та затверджений науково-

методичною радою факультету ветеринарної медицини Дніпропетровського державного аграрного університету.

Матеріали дисертації використовуються в навчальному процесі, зокрема науково-педагогічним складом кафедри епізоотології та інфекційних хвороб ДДАУ на лекційних курсах та на лабораторно-практичних заняттях з мікробіології та епізоотології.

Особистий внесок здобувача. Автор дисертації самостійно вивчив усі доступні наукові літературні джерела за темою науково-дослідної роботи, провів аналіз даних офіційної звітності частоти виявлення мікобактерій з проб біологічного матеріалу бактеріологічним методом, зробив математичну обробку отриманих даних та оформив дисертацію. Експериментальну частину досліджень, автор виконав, за участі співробітників кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпропетровського державного аграрного університету та НДІ біології Дніпропетровського національного університету. Виділення штамів мікобактерій з проб біологічного матеріалу та їх дослідження проводили за безпосередньої участі доктора ветеринарних наук, професора О.А. Ткаченка, аспіранта кафедри епізоотології та інфекційних хвороб В.В. Глебенюка, вивчення ліпідного складу штамів мікобактерій під керівництвом кандидата біологічних наук, доцента І.О. Філоник за що автор роботи висловлює їм щире подяку.

Окрема подяка висловлюється кандидату біологічних наук, професору ДДАУ Л.М. Степченко за люб'язно наданий для дослідження гідрогумат.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації обговорювалися на засіданнях кафедри епізоотології та інфекційних хвороб ДДАУ під час звіту аспірантів про виконану роботу, а також доповідалися на науково-практичних конференціях: “Перспективи розвитку ветеринарної медицини України”, присвяченої 10-річчю заснування факультету ветеринарної медицини Луганського НАУ (26 – 28 вересня 2007 року, м. Луганськ); “Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини”, присвяченої 100-річному ювілею кафедри мікробіології та біотехнології Харківської державної зооветеринарної академії (27 – 29 листопада 2007 року м. Харків).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 5 наукових праць у фахових виданнях, затверджених ВАК України, та отримано патент України на корисну модель живильне середовище для культивування мікобактерій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота включає вступ, огляд літератури, матеріали та методи виконання роботи, результати власних досліджень, обговорення результатів досліджень, додатки та список використаних джерел. Робота викладена на 158 сторінках комп'ютерного набору, проілюстрована 24 таблицями та 22 рисунками. Список використаних джерел включає 265 найменування, у тому числі 46 іноземних.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Роботу виконували у навчально-дослідній лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпропетровського державного аграрного університету у період з 2004 по 2008 рр.

З метою аналізу епізоотичної ситуації щодо туберкульозу великої рогатої худоби у Дніпропетровській області у період з 2000 по 2007 рр. вивчали та аналізували річні звіти офіційної статистики про кількість неблагополучних пунктів щодо туберкульозу та реагуючих на ППД-туберкулін для ссавців тварин. У деяких випадках, для більшої точності і оцінки ситуації, безпосередньо у господарстві проводили алергічні дослідження великої рогатої худоби з використанням ППД-туберкуліну для ссавців.

Для вивчення бактеріологічної ефективності традиційних методів діагностики використовували офіційні статистичні дані по Дніпропетровській області. З цією метою проаналізували річні звіти державної служби ветеринарної медицини з 2000 по 2007 рр.

Передпосівну обробку біологічного матеріалу від великої рогатої худоби (лімфатичні вузли), реагуючої на ППД- туберкулін для ссавців, здійснювали за методиками В.М. Матузенка зі співавт., А.П. Алікаєвої, Гона-Левенштейна-Суміюші, флотації та комбінації методів В.М. Матузенка, А.П. Алікаєвої, Гона-Левенштейна-Суміюші з флотацією та методом флотації.

Для вивчення біологічних властивостей мікобактерій використовували епізоотичні *M. bovis* та швидкорослі атипові мікобактерії, виділені з лімфатичних вузлів великої рогатої худоби, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців.

У дослідженнях було використано 17 штамів мікобактерій 12 виділених під час дослідження проб біологічного матеріалу (дев'ять *M. bovis* та три атипові мікобактерії), а також п'ять музейних штамів *M. bovis* – «Шахтар», № 1034, 41 та атипові мікобактерії № 41, 21.

У виділених культур мікобактерій вивчали такі властивості: час появи перших колоній та їх середню кількість на щільних яєчних живильних середовищах; морфологічні властивості колоній (розмір, форму, краї колоній, колір); каталазну та пероксидазну активність за методикою Г.Н. Першина, Зикової Т.Н. (1958); ріст на середовищі з додаванням 0,5–1,0 мг/см³ натрію саліцилату згідно з настановою по лабораторній діагностиці туберкульозу (Матузенко В.М., Троценко З.Р. та ін., 1994). Тинкторіальні властивості виділених мікобактерій досліджували шляхом фарбування мазків за методом Ціль-Нільсена з подальшою мікроскопією за допомогою мікроскопів Біолам Л-211 та Sunny.

Вивчення патогенних властивостей проводили на морських свинках, а у деяких випадках, для уточнення виду мікобактерій, – на кролях та курях. Вираженість патологоанатомічних змін та їх ступінь визначали за методикою Триус М.С. (1973). Усього для біологічних досліджень було використано 76 морських свинок, шість кролів та шість курей.

Для встановлення впливу гідрогумату на розмноження видів мікобактерій

попередньо досліджували вплив його в різних концентраціях. Дослідження впливу гідрогумату в оптимальній концентрації здійснювали шляхом різноваріантних досліджень з культурами мікобактерій та пробами біологічного матеріалу. Як контрольні використовували середовища Мордовського та ДП «Ветеринарна медицина», м. Харків.

Накопичення біологічної маси *M. bovis* та атипових мікобактерій, для вивчення їх ліпідного складу здійснювали на базі навчально-дослідної лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпропетровського державного аграрного університету. Дослідження ліпідного складу мікобактерій проводили у НДІ біології Дніпропетровського національного університету під безпосереднім керівництвом кандидата біологічних наук Філоник І.О., за що висловлюємо їй щире вдячність.

Для накопичення біомаси мікобактерій використали живильне середовище для культивування мікобактерій (з 0,125%-вим розчином гідрогумату) та середовище Мордовського.

Виділення загальних ліпідів із зразків біомаси мікобактерій проводили за методикою Фолча в модифікації Блайя-Дайєра для мікробіологічних проб (Кейтс М., 1975).

Фракційний склад ліпідів вивчали за методом тонкошарової хроматографії (ТШК) на селікагелевих пластинках Silufol (Чехія), попередньо знежирених перегоненим ацетоном та інактивованих за температури 100 °С протягом години, у системі розчинників – гексан:діетиловий ефір: метанол: льодяна оцтова кислота у співвідношенні 9:2:0,2:0,3 (Кейтс М., 1975).

Компонентний склад фракцій вільних жирних кислот (ВЖК) у зразках біомаси мікобактерій, культивованих на різних середовищах, проводили, за методом газорідинної хроматографії (ГРХ) на газовому хроматографі Chrom-5 („Laboratori Pristroje“, Чехія) після попереднього метилювання. Аналіз зразків метилових ефірів жирних кислот проводили за таких умов: колонка L=1 м ×4 мм, на сорбенті Хроматон N-Super з 5 % SP 2100 (0,16 – 0,20 мм). Температуру колонки програмували від 180 до 270 °С зі швидкістю нагрівання 5 °С/хв; температура випаровування становила 200 °С, детектора – 230 °С, газ-носій – азот (осч), полуменево-іонізаційний детектор (Кейтс М., 1975). Розрахунки та статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою персонального комп'ютера в електронних таблицях Excel Microsoft Office 2003.

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Епізоотична ситуація щодо туберкульозу великої рогатої худоби у Дніпропетровській області у період з 2000 по 2007 рр. Аналізуючи матеріали звітності за досліджуваний період, встановлено, що епізоотична ситуація щодо туберкульозу великої рогатої худоби у Дніпропетровській області була досить напруженою. За звітний період в області зареєстровано 18 неблагополучних пунктів, з цього захворювання. Середня кількість реагуючого на ППД-туберкулін для ссавців поголів'я серед усіх досліджених тварин становила 2,28-13,96 %, у тому числі реагуючих корів – 1,00 -17,08 %.

Різну кількість реагуючих тварин можна обумовити складністю прояву інфекційного та напруженістю епізоотичного процесів, патогенними та вірулентними властивостями збудника туберкульозу, а також тривалістю неблагополуччя господарства. Наприклад, у господарствах, де неблагополуччя тривало до двох років, реагуючих на ППД-туберкулін тварин було 0,98-37,00 %, у тому числі корів 1,06-49,60 %, а у господарствах, де туберкульоз тварин реєструвався шість років, кількість реагуючих склала 1,28-16,50 % від досліджених тварин, у тому числі корів 1,04-7,39 %. Досліджуючи алергічно поголів'я великої рогатої худоби благополучного щодо туберкульозу НДГ „Самарський” Дніпропетровського державного аграрного університету, було встановлено, що велика рогата худоба цього господарства реагувала на ППД-туберкулін для ссавців, але у значно меншій кількості (0,47-5,02 %). На діагностичному забої усіх реагуючих тварин цього господарства характерних для туберкульозу патологоанатомічних ознак невиявлено, а за культурального дослідження виділено три культури атипичних мікобактерій.

Частота виділення мікобактерій з біологічного матеріалу від великої рогатої худоби Дніпропетровської області. За даними відділу по боротьбі з туберкульозом Дніпропетровської державної обласної лабораторії ветеринарної медицини, середня ефективність виділення культур мікобактерій з проб біологічного матеріалу з 2000 по 2007 рр. склала 5,64 %. Культури мікобактерій виділяли без будь-яких закономірностей. Так з досліджених проб матеріалу виділено культур мікобактерій у 2000 році з 144 в 4,16 % випадків, тоді, як у 2007 році одержаний негативний результат. Причини негативного результату дослідження могла бути недосконалість методів бактеріологічного дослідження, а саме передпосівної обробки біоматеріалу

Експерименти з дослідження бактеріологічної ефективності методів передпосівної підготовки суспензії біологічного матеріалу великої рогатої худоби неблагополучних і благополучних щодо туберкульозу господарств. Порівнюючи під час дослідження різні методи підготовки суспензії біологічного матеріалу (метод ферментативного збагачення, А.П. Алікаєвої, Гона-Левенштейна-Суміюші, флотації та комбінації трьох методів, які перелічені вище з методом флотації), було встановлено що найбільш ефективним при культуральних дослідженнях є метод ферментативного збагачення – 65, 6 %, менш ефективним – метод ферментативного збагачення у поєднанні з флотацією – 51,0 %; менш ефективними виявилися методи А.П. Алікаєвої та А.П. Алікаєвої у поєднанні з флотацією – відповідно по 43, 7 %; Гона-Левенштейна-Суміюші – 36, 4 %; Гона-Левенштейна-Суміюші у поєднанні з флотацією – 21, 8 %; методу флотації – 14, 5 %. При дослідженні проб з благополучних господарств культури мікобактерій були виділені лише методами ферментативного збагачення та ферментативного збагачення у поєднанні з флотацією, ефективність яких склала відповідно 30 та 20 %.

Найбільш ефективним за біологічного дослідження виявився метод ферментативного збагачення – 80,12 %, дещо менш ефективним метод ферментативного збагачення у поєднанні з флотацією – 58, 2 %. Ефективність методів А.П. Алікаєвої та методу А.П. Алікаєвої у поєднанні з флотацією склала відпо-

відно по 43,73 %, ефективність методу Гона-Левенштейна-Суміюші – 36,4 %, а ефективність методу Гона-Левенштейна-Суміюші у поєднанні флотацією – 21,8 %, ефективність методу флотації – 14,5 %.

Виділені на щільних живильних середовищах 12 культур мікобактерій за тинкторіальними, культуральними, морфологічними, біохімічними та біологічними властивостями віднесені: три культури (№ 35, № 36/1 та 36/2) – до атипових мікобактерій, та дев'ять (з № 19 по 34) – до *M. bovis*. Виділені мікобактерії формували колонії у проміжку від п'ятої до 44-ої доби у вигляді дрібних та середніх, S- та R-форм кольору слонової кістки, жовтуватих, світло-коричневих. Бактеріоскопією мазків встановили дрібні, червоні, зернисті палички із заокругленими кінцями.

Вплив гідрогумату на інтенсивність росту мікобактерій. Досліджуючи вплив гідрогумату у різних розведеннях (від 0,25 до 0,001%) на інтенсивність росту *M. bovis* штаму «Шахтар», було встановлено, що на середовищі з концентрацією гідрогумату 0,125 % ріст колоній розпочався у 2,5 раза швидше, ніж на контролі (середовище Мордовського), а їх середня кількість, на десятий день від початку росту, у дослідному середовищі була у 2,83 раза більшою, ніж у контролі ($P > 0,95$). Середовище з гідрогуматом у концентрації 0,125 % виявилось найбільш ефективним порівняно з іншими концентраціями та контролем при культивуванні *M. bovis* штаму «Шахтар». Виявлено зворотній взаємозв'язок середньої сили між початком росту колоній та концентрацією гідрогумату у середовищі ($r = -0,74$; $P > 0,95$), а також прямий взаємозв'язок середньої сили між середньою кількістю колоній, на 10-й день від початку росту, та концентрацією гідрогумату у середовищі ($r = 0,72$; $P > 0,95$), що свідчить про стимулюючий вплив гідрогумату у складі щільного живильного середовища на інтенсивність росту мікобактерій.

Подібні дослідження були проведені на атипових мікобактеріях штамів 36/2 та № 35. У результаті досліджень встановлено, що початок росту культури атипових мікобактерій № 36/2 на середовищі з концентрацією гідрогумату 0,125 % почався у 1,4 раза швидше, ніж у контролі, а середня кількість колоній цих мікобактерій на першу та п'яту день від початку росту була відповідно у 3,5 та 1,56 раза більшою ніж на середовищі Мордовського ($P > 0,95$).

Досліджуючи атипові мікобактерії штаму № 35 встановлено що, початок росту колоній на середовищі з гідрогуматом в концентрації 0,125 % у 1,25 рази перевищував цей показник у контролі. Середня кількість колоній атипових мікобактерій № 35 на середовищі з гідрогуматом (0,125%) на 1-й та 5-й день від початку росту у 7,7 ($P > 0,999$) та 2,37 ($P > 0,95$) була відповідно більшою, ніж на середовищі Мордовського. В результаті досліджень встановлено, що оптимальною концентрацією гідрогумату у середовищі є – 0,125 %. В подальшому провели дослідження проб біологічного матеріалу культуральним методом з використанням середовища з гідрогуматом у концентрації 0,125 %. В якості контролю було використано середовище Мордовського та сухе живильне середовище для культивування мікобактерій ДП «Ветеринарна медицина» м. Харків. Результати досліджень засвідчили, що найбільша кількість мікобактерій виділена на середовищі з гідрогуматом – дев'ять культур (34,6 %); на середовищі

Мордовського – шість культур (23 %); на сухому живильному середовищі для культивування мікобактерій ДП «Ветеринарна медицина» – п'ять (19,2 %), що у 1,5 та 1,8 рази відповідно менше, ніж на дослідному середовищі. Найвища бактеріологічна ефективність виявлена у середовища для культивування мікобактерій з додаванням 0,125 % розчину гідрогумату. При цьому на середовищі з гідрогуматом початок формування колоній мікобактеріями відмічено (у пробах з неблагополучних господарств) на $12,50 \pm 0,64$ день, та на $9,60 \pm 0,37$ день (у пробах з благополучних господарств). На середовищі Мордовського формувалися колонії відповідно на – $15,70 \pm 0,29$ день (у пробах з неблагополучних господарств) та на $12,30 \pm 0,61$ день (у пробах з благополучних господарств). На сухому живильному середовищі для культивування мікобактерій ДП «Ветеринарна медицина» м. Харків аналізовані показники становили відповідно – $18,00 \pm 0,44$ днів та повна відсутність росту культур. Різниця показників початку росту склала відповідно для середовища з 0,125 % розчином гідрогумату та середовища Мордовського – 1,26 ($P > 0,999$) та 1,28 рази ($P > 0,95$). Для середовища ДП «Ветеринарна медицина» м. Харків та середовища з 0,125 % розчином гідрогумату різниця складає 1,44 рази ($P > 0,999$). Середня кількість колоній на 10-й день після початку росту на середовищі для культивування мікобактерій з додаванням 0,125 % розчину гідрогумату склала для проб від тварин з не благополучних господарств $24,50 \pm 2,23$, а для проб від тварин з благополучних $32,2 \pm 1,26$ колоній. На середовищі Мордовського середня кількість колоній на 10-й день після початку росту становила з проб від тварин з не благополучних господарств – $14,90 \pm 1,32$, а з проб від тварин з благополучних господарств – $21,90 \pm 0,69$ колоній. На сухому живильному середовищі для культивування мікобактерій ДП «Ветеринарна медицина» м. Харків ці показники становили відповідно $11,37 \pm 1,62$ та повна відсутність росту колоній. Різниця середньої кількості колоній для середовища з 0,125 % розчином гідрогумату та середовища Мордовського склала відповідно у пробах з неблагополучних господарств – 1,64 ($P > 0,999$), а у пробах з благополучних господарств – 1,47 рази ($P > 0,99$). Для середовища з 0,125 % розчином гідрогумату та середовища ДП «Ветеринарна медицина» м. Харків різниця показників середньої кількості колоній у пробах з неблагополучних господарств складає 2,15 рази ($P > 0,999$).

Середовище для культивування мікобактерій з додаванням 0,125 % розчину гідрогумату за дослідження біологічного матеріалу від великої рогатої худоби, у середньому, у 1,5–1,8 рази дає відповідно більше позитивних результатів, ніж середовище Мордовського та сухе живильне середовище для культивування мікобактерій ДП «Ветеринарна медицина» м. Харків.

За матеріалами дослідження оформлено патент на корисну модель (Пат. на кор. мод. 28293 Україна, МКІ С 12 N 1/00. Живильне середовище для культивування мікобактерій / Ткаченко О.А., Кулішенко О.М. – № у 2007033 06; заявл. 27.03.2007; опубл. 10.12.2007, Бюл. №20).

Результати комісійної кафедральної перевірки засвідчили, що середовище з додаванням гідрогумату у концентрації 0,125 % є більш ефективніше у порівнянні з контролем у 1,96–3,72 рази. У зв'язку з цим необхідно було з'ясувати, які метаболічні процеси (механізми) зумовлюють активізацію обміну ре-

човин. Для цього були проведені наступні дослідження, зокрема ліпідів мікобактерій.

Ліпідний склад видів мікобактерій культивованих на різних середовищах. Ліпідний склад видів мікобактерій культивованих на живильному середовищі з гідрогуматом та середовищі Мордовського. Досліджуючи ліпідний склад мікобактерій різних видів, які були культивовані на середовищі для культивування мікобактерій з 0,125 % розчином гідрогумату та середовищі Мордовського, з метою визначення механізму впливу гідрогумату на ростові властивості мікобактерій було встановлено, що гідрогумат у складі середовища для культивування мікобактерій зменшує загальну кількість ліпідів патогенних мікобактерій у 1,2 раза ($P > 0,95$); достовірно не змінює вміст фракцій загальних ліпідів (фосфоліпідів, диацилгліцеролів, стеринів, вільних жирних кислот, триацилгліцеролів, ефірів стеринів); впливає на зміну фракцій вільних жирних кислот. Так було встановлено, що вміст ненасичених вільних жирних кислот ($C_{16:1}$; $C_{18:1}$; $C_{18:2,3}$) у дослідному зразку становив $35,53 \pm 1,7$ %, а у контрольному – $40,54 \pm 1,76$ %, що у 1,14 раза більше, ніж на середовищі з додаванням 0,125% розчину гідрогумату ($P > 0,95$). Вміст насичених кислот у досліді був вищий у 1,08 раза і становив $64,47 \pm 2,02$ %, проти $59,46 \pm 1,67$ % у контролі ($P > 0,95$). Коефіцієнт ненасиченості (відношення суми ненасичених жирних кислот до суми насичених) у досліді складав $0,55 \pm 0,027$, а у контролі $0,68 \pm 0,057$. Повідомляється, що при дії несприятливих факторів на мікобактерії, культивованих на щільних живильних середовищах, включається механізм адаптації і збільшується вміст ненасичених жирних кислот. З огляду на дані наших досліджень, можна припустити, що гідрогумат у складі щільного живильного середовища сприяє метаболізму мікобактерій і створює більш благоприємні умови для їх розмноження.

Подібні дослідження з вивчення ліпідів були проведені на атипівих мікобактеріях. В результаті досліджень було встановлено, що гідрогумат достовірно не змінює вміст загальної кількості ліпідів в атипівих мікобактерій; із фракцій ліпідів достовірно змінює вміст фракції стеринів ($P > 0,99$); змінює вміст вільних жирних кислот. Дослідження засвідчили, що у дослідному та контрольному зразках біомаси атипівих мікобактерій вміст ненасичених вільних жирних кислот склав відповідно $41,54 \pm 0,69$ % та $50,50 \pm 1,25$ %. Різниця цих показників становить 1,2 рази ($P > 0,999$). Вміст насичених жирних кислот у досліді становив у $58,46 \pm 1,02$ %, а у контролі $49,50 \pm 1,03$ %, що у 1,18 рази менше, ніж на середовищі з додаванням гідрогумату ($P > 0,999$). Коефіцієнт ненасиченості (відношення ненасичених жирних кислот до насичених) у досліді складав $0,71 \pm 0,13$, а у контролі $1,02 \pm 0,1$.

Окрім зазначеного вище, збільшення вмісту насичених жирних кислот у дослідному зразку біомаси мікобактерій у порівнянні з контролем, відмічена також тенденція до збільшення у дослідному зразку вмісту насичених довголанцюгових жирних кислот (генейкозанової, бегенової, тетракозанової, гексакозанової) поряд з тенденцією зменшення вмісту насичених коротколанцюгових жирних кислот (пальмітинова, маргарінова, стеаринова, нонадеканова), що теж вказує на високу адаптивну здатність атипівих мікобактерій штаму №

36/2 під впливом гідрогумату. Все вищезазначене дозволяє припустити, що підвищення фракції насичених жирних кислот та збільшення вмісту її окремих представників, а також тенденція до зростання вмісту довголанцюгових насичених жирних кислот, говорить про те, що середовище з гідрогуматом є більш благоприємним для культивування атипівих мікобактерій штаму № 36/2 і гідрогумат у складі живильного середовища сприяє метаболізму мікобактеріальних клітин і виконує роль адаптогену.

Разом з цим, за впливу гідрогумату на жирнокислотний склад мікобактерій відмічена тенденція до збільшення довголанцюгових насичених жирних кислот, як у епізоотичних штамів мікобактерій так і у атипівих мікобактерій. Зокрема збільшився вміст пентакозанової кислоти у штаму атипівих мікобактерій штаму № 36/2 та у штаму *M. bovis* № 24. Відмічена тенденція до зростання вмісту насичених довголанцюгових жирних кислот (генейкозанової, тетракозанової, гексакозанової) поряд з тенденцією до зменшення вмісту насичених коротколанцюгових жирних кислот (пальмітинової, маргаринової, стеаринової, нонадеканової) у атипівих мікобактерій штаму № 36/2.

Досліджуючи масу знятої культури мікобактерій з середовища з гідрогуматом та середовища Мордовського, було встановлено, що маса культури видів мікобактерій на контрольному середовищі виявилася у 4,05 рази нижчою, ніж на дослідному ($P > 0,99$). В той же час, як свідчать результати досліду, не всі штами мікобактерій розмножуються на середовищі з гідрогуматом з однаковою інтенсивністю. Це визначає різну кількість накопиченої бактерійної маси: від 1,8–1,9 рази (штами № 36/2, «Шахтар», № 41, № 21) до 18,6 разів (штам №101).

ВИСНОВКИ

1. У дисертації визначений вплив гідрогумату на життєздатність мікобактерій та вивчена ефективність впливу різних способів передпосівної обробки біологічного матеріалу на результати бактеріологічного дослідження, проведене порівняльне випробування живильних середовищ, у тому числі удосконаленого середовища з гідрогуматом, вивчена ефективність застосування різних середовищ шляхом визначення строків та інтенсивності росту колоній на різних живильних середовищах та обґрунтована доцільність використання запропонованого удосконаленого середовища для культивування мікобактерій різних видів, визначений ліпідний склад мікобактерій та його зміни в процесі адаптації збудників мікобактеріальних інфекцій.

2. В господарствах Дніпропетровської області на поголів'ї великої рогатої худоби циркулюють збудники туберкульозу і атипіві мікобактерії – у 18 неблагополучних пунктах, виявлених впродовж останніх семи років, кількість реагуючого на внутрішньошкірну туберкулінову пробу поголів'я коливалась – у межах 2,28-13,96 %, а в благополучних господарствах у межах 0,47-5,02 %; з 12 виділених культур дев'ять віднесені *M. bovis* і три – до атипівих мікобактерій.

3. Ефективність бактеріологічного дослідження біоматеріалу від великої

рогатої худоби, забитої з діагностичною метою впродовж 2000-2007 рр., за даними державної діагностичної установи ветеринарної медицини, коливається в межах від 1,12 до 9,65 %.

4. З методів передпосівної підготовки біологічного матеріалу, у т.ч. за А.П. Алікаєвою, Гоном-Левенштейном-Суміюші, ферментативного збагаченням біологічного матеріалу, флотацією та комбінацією перших трьох методів з флотацією, найбільш результативним виявився метод ферментативного збагачення біологічного матеріалу, ефективність застосування якого коливається у межах 65,6% та 80,12 %.

5. Встановлена пряма залежність інтенсивності росту та зворотна – появи перших колоній штаму *M.bovis* “Шахтар”, від концентрації гідрогумату у живильному середовищі. Оптимальною концентрацією гідрогумату у щільному живильному середовищі для культивування мікобактерій є – 0,125 %. Ефективність використання вказаного середовища у порівнянні з середовищем Мордовського виявилася вищою у 2,5-2,8 рази при культивуванні штаму *M.bovis* “Шахтар” і у 1,96-5,6 рази – при культивуванні атипових мікобактерій штамів № 36/2 та № 35.

6. Застосування живильного середовища з гідрогуматом у порівнянні з середовищами Мордовського та ДП “Ветеринарна медицина” сприяє – зростанню кількості виділених культур мікобактерій відповідно у 1,5 та 1,8 рази; збільшенню кількості утворених колоній патогенних мікобактерій відповідно у 1,64-2,15 рази; скороченню первинного росту колоній відповідно у 1,25-1,44 рази. При культивуванні атипових мікобактерій на удосконаленому середовищі з гідрогуматом у порівнянні з середовищем Мордовського зростає швидкість формування колоній і збільшується їх кількість відповідно у 1,28-1,47 рази.

7. Склад ліпідів *M. bovis* “Шахтар”, при культивуванні на удосконаленому середовищі з гідрогуматом у порівнянні з культивуванням на середовищі Мордовського характеризується достовірним зменшенням загальної кількості ліпідів і ненасичених вільних жирних кислот відповідно у 1,2 та у 1,14 рази за одночасного збільшення вмісту насичених вільних жирних кислот, зокрема маргаринової, пентакозанової у 2,56-2,81 рази.

8. Ліпідний склад атипових мікобактерій, при їх культивуванні на запропонованому середовищі з гідрогуматом у порівнянні з культивуванням на середовищі Мордовського, достовірно не змінюється, за винятком фракції стеринів, а також характеризується достовірним зменшенням вмісту ненасичених вільних жирних кислот у 1,2 рази та достовірним зростанням вмісту насичених вільних жирних кислот у 1,55-2,93 рази і вмісту довголанцюгових жирних кислот (C_{21} - C_{27}) поряд із зменшенням вмісту коротколанцюгових вільних жирних кислот (C_{12} - C_{19}) у атипових мікобактерій штаму № 36/2.

9. Наявність лауринової і гексакозанової жирних кислот при культивуванні атипових мікобактерій і їх відсутність при культивуванні *M. bovis* на удосконаленому середовищі, може мати ідентифікаційне значення.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. З метою покращення якості бактеріологічної діагностики туберкульозу доцільно використовувати живильне середовище для культивування мікобактерій (Патент України № 28293 на корисну модель «Живильне середовище для культивування мікобактерій»).

2. Методика виготовлення та застосування удосконаленого живильного середовища з гідрогуматом увійшла до посібника з лабораторної діагностики туберкульозу тварин, який затверджений та прийнятий до впровадження у практику ветеринарної медицини Державним комітетом ветеринарної медицини України (протокол №1 від 23-24.12.2009 року) та затверджений науково-методичною радою факультету ветеринарної медицини Дніпропетровського державного аграрного університету.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Кулішенко О.М.** Вплив гідрогумату на інтенсивність розмноження *M. bovis* / О.М. Кулішенко // Ветеринарні науки: зб. наук. праць Луганського НАУ. – Луганськ, 2007. – № 78/101. – С. 332–338. (*Дисертант провів культивування мікобактерій на середовищі з гідрогуматом у різній концентрації та вивчив вплив цієї речовини на ростові властивості M. bovis*).

2. **Кулішенко О.М.** Практичне значення гідрогумату в бактеріологічній діагностиці туберкульозу / О.М. Кулішенко // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини: зб. наук. праць ХДЗВА, присвячений 100 – річному ювілею кафедри мікробіології та біотехнології ХДЗВА. – Харків: РВВ ХДЗВА, 2007. – Вип. 15(40), ч.2, т.1 «Ветеринарні науки». – С. 72 – 79. (*Дисертант дослідив вплив середовища з гідрогуматом на інтенсивність росту мікобактерій при дослідженні проб біологічного матеріалу*).

3. Ткаченко О.А. Вплив гідрогумату на швидкість росту атипичних мікобактерій / О.А. Ткаченко, **О.М. Кулішенко** // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. – 2007. – №2. – С. 86 – 88. (*Дисертант провів культивування атипичних мікобактерій на середовищі з гідрогуматом в різній концентрації та вивчив вплив цієї речовини на їх ростові властивості*).

4. **Кулішенко О.М.** Залежність адаптивної здатності *M. bovis* від впливу гідрогумату / О.М. Кулішенко, М.В. Зеленська, О.А. Ткаченко // Ветеринарна медицина України. – 2008. – № 7. – С. 30–33. (*Дисертант дослідив вплив середовища з гідрогуматом на інтенсивність росту атипичних мікобактерій та епізоотичних штамів M. bovis при пересівах та дослідженні проб біологічного матеріалу*).

5. **Кулішенко О.М.** Ліпідний склад *M. bovis* культивованого на різних середовищах / О.М. Кулішенко // Ветеринарна медицина України. – 2009. – № 2. – С. 30 – 33. (*Дисертант провів накопичення бактеріальної маси мікобактерій (M. bovis), дослідив ліпідний склад та узагальнив результати роботи*).

б. Пат. на кор. мод. 28293 Україна, МКІ С 12 N 1/00. Живильне середовище для культивування мікобактерій / Ткаченко О.А., Кулішенко О.М. – № u 200703306; заявл. 27.03.2007; опубл. 10.12.2007, Бюл. № 20. (*Дисертант дослідив вплив середовища з гідрогуматом на інтенсивність росту мікобактерій*).

Кулішенко О.М. Оцінка бактеріологічних методів діагностики туберкульозу. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія. – *Одеський державний аграрний університет.* – *Одеса, 2010.*

Дисертація стосується проблеми бактеріологічної діагностики туберкульозу. В роботі проведено аналіз епізоотичної ситуації щодо туберкульозу великої рогатої худоби у Дніпропетровській області з 2000 по 2007 рр. та проведений аналіз ефективності методів бактеріологічної діагностики туберкульозу. Проведене порівняння ефективності застосування різних методів передпосівної підготовки суспензії біологічного матеріалу.

Досліджено тинкторіальні, культуральні, морфологічні, біохімічні та біологічні властивості виділених 12 культур мікобактерій.

Досліджено вплив гідрогумату на інтенсивність розмноження різних видів мікобактерій та запропоновано удосконалене середовище для культивування мікобактерій з 0,125 % розчином гідрогумату, на яке отримано патент на корисну модель № 28293.

Проведене вивчення ефективності застосування удосконаленого середовища з гідрогуматом, за дослідження проб біологічного матеріалу у порівнянні з середовищем Мордовського та сухим живильним середовищем для культивування мікобактерій ДП «Ветеринарна медицина» м. Харків.

Проведено накопичення біомаси мікобактерій, які були культивовані на запропонованому середовищі з гідрогуматом та середовищі Мордовського з наступним дослідженням їх ліпідного складу для вивчення механізмів стимулюючого впливу гідрогумату на мікобактерій.

Ключові слова: туберкульоз, епізоотичний процес, бактеріологічна діагностика, методи передпосівної обробки, гідрогумат, пришвидшення росту, штами мікобактерій, ліпідний склад мікобактерій, адаптивна здатність.

Кулишенко О.М. Оценка бактериологических методов диагностики туберкулёза. – Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни и иммунология. – *Одесский государственный аграрный университет.* – *Одесса, 2010.*

Диссертация касается проблемы бактериологической диагностики туберкулёза. В работе проведён анализ эпизоотической ситуации по туберкулёзу

крупного рогатого скота в Днепропетровской области в период с 2000 по 2007 гг. и анализ эффективности методов бактериологической диагностики туберкулёза. Проведено сравнение эффективности применения различных методов подготовки суспензии биологического материала для бактериологического посева.

У выделенных 12 культур микобактерий исследовано тинкториальные, культуральные, морфологические, биохимические и биологические свойства.

Исследовано влияние гидрогумата на интенсивность размножения разных видов микобактерий и предложено усовершенствованная питательная среда для культивирования микобактерий с 0,125 % раствором гидрогумата на которую получено патент на полезную модель № 28293.

Проведено сравнение эффективности применения предложенной среды для исследования проб биологического материала. В качестве контроля были использованы среда Мордовского и сухая питательная среда для культивирования микобактерия ДП «Ветеринарная медицина» г. Харьков.

Проведено накопление биомассы микобактерий, которые были культивированные на предложенной среде и на среде Мордовского с последующим исследованием их липидного состава с целью изучения механизмов стимулирующего влияния гидрогумата на микобактерии.

Ключевые слова: туберкулёз, эпизоотологический процесс, бактериологическая диагностика, методы обработки биологического материала, гидрогумат, ускорение роста, штаммы микобактерий, липидный состав микобактерий, адаптивная способность.

Kulishenko O.N. The Estimation of the bacteriological methods of the diagnostics tuberculosis. - Manuscript.

The Thesis on competition scientific degree candidate of the veterinary sciences on professions 16.00.03 – veterinary microbiology, epizootology, infectious disease and immunology. – Odessa state agrarian university. – Odessa, 2010.

The dissertation concerns researches of bacteriological diagnostics of a tuberculosis. In work it is analysed epizootological a situation on tuberculosis cattle in the Dnepropetrovsk area during the period with 2000 for 2007 years and it is carried out the analysis of efficiency of methods of bacteriological diagnostics of a tuberculosis. Comparison of efficiency of application of various methods of preparation of suspension of a biological material for bacteriological crops is spent.

At the allocated 12 cultures mycobacterium it is investigated cultural, morphological, biochemical and biological properties.

Influence hydrohumates on intensity of reproduction of times of kinds mycobacterium is investigated and it is offered an advanced nutrient medium for cultivated mycobacterium from 0,125 % solution hydrohumates on which is taken out the patent for useful model № 28293.

Comparison of efficiency of application of the offered environment for research of tests of a biological material is conducted. As the control have been used the nutrient medium Mordovian and a dry nutrient medium for cultivated

mycobacterium «Veterinary medicine» Kharkov.

Biomass accumulation mycobacterium which were cultivated on the offered nutrient medium and on nutrient medium Mordovian with their subsequent research lipids structure for the purpose of studying of mechanisms of stimulating influence hydrohumates on mycobacterium spent.

The Keywords: tuberculosis, epizootological process, bacteriological diagnostics, methods processing, hydrohumates, speedup of the growing, strain mycobacterium, lipids composition mycobacterium, adaptive ability.

Підписано до друку 02.03.2010. Формат 60×90/16. Папір друкарський.
Ум. друк. арк. 07,. Обл.-вид. арк. 0,9. Зам. № 1209
Тираж 100 примірників.

Видання та друк – ЦОП «ІДЕЯ» м. Дніпропетровськ, пр. Карла Маркса,60, оф. 2
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1367 від 10.02.08