

2. Туберкульозний інфекціогенез розвивається в організмі мурчаків під впливом короткочасного переохолодження без кардинальних трансформацій з індукцією генформи tbc і туберкульозного фтизу.

---

## **ВИДОВА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПАТОГЕННИХ МІКОБАКТЕРІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛР**

*Зажарський В., к.вет.н, доцент,  
Сосницький О., д.вет.н., професор,  
Бібен І., к.вет.н, доцент, декан факультету ветеринарної медицини,  
Детюк Л, здобувачка вищої освіти,  
Нестерук Н., здобувачка вищої освіти*

*Дніпровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпро, Україна  
[saidgaeus@gmail.com](mailto:saidgaeus@gmail.com)*

**Вступ.** Туберкульоз – це емерджентне інфекційне зоонозне захворювання людей, тварин, птиці та пойкилотермних організмів, яке частіше перебігає хронічно й характеризується утворенням у внутрішніх органах і тканинах типових вузликів – туберкул, схильних до казеозного розпаду.

Мікробіальним етіофактором туберкульозу є патогенні прокаріоти родини *Mycobacteriaceae*. У ссавців захворювання викликають *M. tuberculosis* & *M. bovis* & *M. murium*, у птахів та свиней – *M. avium*, а також *M. piscium* – у риб і рептилій.

Мікобактеріальні прокаріоти володіють родоспецифічними тотожними морфотінкторіальними, культуральними, антигенними та біохімічними властивостями, і для видової диференціації потрібно проводити біологічне дослідження. Але це тривалий і коштовний процес який має етичні та біологічні перешкоди, тому у сучасних умовах використовують ПЛР (PCR) для етіотропної індикації та видової ідентифікації ізольованих бактеріологічними методами культур патогенних мікобактерій.

За результатами власних епідеміологічних досліджень мікобактеріальних інфекцій на території м. Дніпро і області в дослідних зразках біоматеріалу від сільськогосподарських тварин за допомогою біологічного методу на мурчаках ізолювали епізоотичний варіант патогенних мікобактерій. Лабораторні тварини загинули з патогномонічною картиною генералізованої форми туберкульозу впродовж 4-6 тижнів, що свідчить за високу вірулентність і біологічну небезпеку ізольованого збудника.

**Мета дослідження:** провести видову ідентифікацію патогенного мікобактеріального прокаріота біобезпечними сучасними молекулярно-генетичними методами, а саме – полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР s. PCR).

**Матеріали і методи.** Лабораторні дослідження з інфектології дослідного біоматеріалу проводили в навчально-науковій лабораторії кафедри інфекційних хвороб тварин ФВМ ДДАЕУ та інфекційному віварії.

Біопробу ставили на мурчаках живою масою тіла 280-300 г, яким вводили матеріал в ділянці паху.

Біоматеріал превентивно обробляли за методом Алікаєвої з використанням 5 % розчину сірчаної кислоти за 30 хв експозиції. Посіви робили на середовище Стоун-Брінгга. Фарбування мазків проводили за Циль-Нільсеном і Грамом.

Отриману бактеріологічними методами чисту культуру збудника ідентифікували до видової приналежності в ПЛР відповідно до діючої настанови.

**Результати досліджень.** Виділення ДНК епізоотичної культури патогенних мікобактерій проводили за наступним алгоритмом.

Встановлювали в штатів необхідну кількість пробірок ємністю 1,5 см<sup>3</sup>. В кожную пробірку вносили 300 мкл лізуючого розчину з гуанідинтіоціонатом та 100 мкл досліджуваного матеріалу (для руйнування клітинної мембрани). Інкубували 5 хв за 65 °С з щільно закритою кришкою. Після охолодження до кімнатної температури в кожную пробірку вносили по 25 мкл сорбенту, старанно перемішували до однорідної завісі. Після дворазового перемішування на вортексі з інтервалом 2-3 хв, залишали проби на 5 хв за кімнатної температури і осаджували сорбент центрифугуванням за 10 тис. об/хв впродовж 30 с. Після осадження сорбенту водну фазу видаляли та в подальшому проводили відмивання сорбентного осаду. В кожную пробірку з підсушеним сорбентним осадом додавали по 50 мкл буфера для елюції ДНК та на 5 хв залишали проби в термостаті за 65 °С, з періодичним струшуванням на вортексі. Після елюції пробірки центрифугували за 12 тис. об/хв одну хв. Отримана надосодова рідина містила очищену ДНК (яку в подальшому зберігали впродовж тижня за 2-8 °С).

Далі проводили ампліфікацію ДНК ізольованих патогенних мікобактерій. Використовували пронумеровані пробірки для проведення ампліфікації ємністю 0,6 мл (або 0,2 мл), включаючи пробірки для позитивного й негативного контролю. За 20-30 хв до готування ампліфікаційної суміші виймали комплект реагентів для ампліфікації з рефрижератору, розморожували вміст. Пробірки з компонентами реакційної суміші та розчином праймерів обережно струшували на вортексі. У кожную пробірку вносили окремими наконечниками з аерозольним бар'єром необхідну кількість кожного реагенту (згідно настанови). Послідовності олігонуклеотидних праймерів для *M. bovis*: TCGTCCGCTGATGCAAGTGC (JB21); CGTCCGCTGACCTCAAGAAG (JB22)

Пробірки обережно струшували для перемішування вмісту та додавали до усіх пробірок по 1 краплі мінеральної олії. Вносили 5 мкл зразка з підготовленої аналізованої проби у відповідну пробірку з ампліфікаційною сумішшю під шар масла для проведення ампліфікації. Також під шар масла вносили в пробірку для негативного контрольного зразка – 5 мкл деіонізованої води, а в пробірку для позитивного контрольного зразка – 5 мкл ДНК позитивного контролю. Переносили пробірки до ампліфікатору і проводили ампліфікацію за відповідною програмою. Після закінчення реакції пробірки передавали у кімнату для аналізу продуктів ПЛР, який проводили поділом фрагментів ДНК в агарозному гелі.

Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР проводиться за наступним алгоритмом.

Готували розчин буфера для електрофорезу. Готували агарозний гель. Готували електрофоретичні камери до заливання агарозного гелю. Охолоджений розчин агарози (50 °С) заливали на платформу завтовшки 5-6 мм та переносили платформу до електрофоретичної камери. Заливали необхідну кількість розчину буфера і далі у відповідну лунку під шар буфера вносили по 10,0 мкл ПЛР-суміші з продуктом ампліфікації так, щоб вміст однієї лунки не перетікав в інші. Встановлювали кришку на камеру, підключали електрофоретичну камеру до джерела живлення, дотримуючись полярності. Електрофорез проходив у градієнті напруги 10 В/см протягом 20-40 хв. Потім промивали 200 мл дистильованої води 2-3 рази. Поміщували агарозний гель на скло УФ-транслюмінатора. Фрагменти аналізованої ДНК виявляли у вигляді смужок при довжині хвилі УФ-випромінювання 310 нм.

Провели облік результатів ПЛР. У негативному контрольному зразку (К-) смужки були відсутні. У позитивних контрольних зразках (К+) виявлялась одна смужка жовтогарячого кольору з розміром 500 пар нуклеотидів.

#### **Висновок.**

ПЛР це біобезпечний сучасний метод видової ідентифікації патогенних мікобактерій, ізольованих з біоматеріалу традиційними лабораторними засобами, який дає можливість

отримати достовірні характеристики досліджуваного біоб'єкта, що базуються на використанні інструментальних молекулярно-генетичних механізмів аналізу і в результаті, на підставі отриманих даних був ідентифікований епізоотичний варіант прокаріот як – *M. bovis*.

## **СИСТЕМА КОМПЛЕКСНОГО ВИКОРИСТАННЯ ФІТОМАСИ ГОРІХУ ВОЛОСЬКОГО (*JUGLANS REGIA*) НА ПРИНЦИПАХ ТЕОРІЇ ДИВЕРСИФІКАЦІЇ**

*Зінов'єв С.Г., к.с.-г.н., с.н.с.,  
Сініцин О.С., аспірант,  
Лобченко С.Ф., к.с.-г.н.*

*Інститут свинарства і АПВ НААН, м. Полтава, Україна  
[kvazimodo2077@gmail.com](mailto:kvazimodo2077@gmail.com)*

Запровадження новітніх технологій органічного свинарства має основним принципом мінімізацію використання при утриманні свиней хімічних препаратів, слідові кількості яких в продукції свинарства негативно впливають якість продукції та стан здоров'я споживачів (Іббатулін М.І., 2019).

Перехід на засоби рослинного походження, максимально можлива відмова від продуктів хімічного синтезу, які, як правило, мають широке коло побічних негативних ефектів, гальмується в основному відносно малим спектром рослинних сполук із дослідженою активністю. Розширення арсеналу таких засобів є надзвичайно актуальним завданням (Hjorth, R. 2017, Skoufos I. et al., 2020, Карпінська Н., 2021).

Кожна рослина дає первинні та вторинні метаболіти, включаючи такі сполуки, як ефірні олії, фенольні сполуки, терпеноїди, алкалоїди, стероїдні сполуки, глікозиди, терпени та дубильні речовини, які можуть бути відповідальними за різні терапевтичні ефекти. Ці рослинні компоненти мають численні сприятливі фізіологічні властивості, такі як антиоксидантні, протизапальні та антиатеросклеротичні. Так, наприклад, різні частини *Juglans regia*, волоського горіха містять сильнодіючі хімічні компоненти, що використовувалися для лікування різних захворювань, включаючи діарею, гіперглікемію, рак, інфекційні захворювання, анорексію, екзему, астму, гельмінтоз, артрит, синусит, шлунково-кишкові розлади, біль, шкірні захворювання, тощо (David Hayes, et al., 2016, Delaviz H., et al., 2017, Dávila-Ramírez, J. et al. 2020).

Таким чином, дослідження для з'ясування точних механізмів, що лежать в основі механізмів дії *Juglans regia* на організм сільськогосподарських тварин є актуальними.

**Мета досліджень.** Створити систему диверсифікації горіхівництва із використанням насаджень і фітомаси горіху волоського (*Juglans regia* L.) для цілей екології та виробництва екологічно безпечних фітопрепаратів для тваринництва.

**Матеріал і методи досліджень.** Відбір фітосировини і побічних продуктів горіхівництва для виготовлення фітопрепаратів здійснювали в різні фенофази *Juglans regia* інтродукованого в науково-виробничому відділі Інституту свинарства і АПВ НААН. В окремому дослідженні використовували фітомасу *Juglans regia* що вирощувались в мовах горіхового саду ТОВ «ІЖА ДЛЯ РОЗДУМІВ». Кількість юглону визначали фотоелектроколориметричним методом (Айзенберг Л.Н., 1966). Визначення суми флавоноїдів проводили методом спектрофотометрії у видимій й УФ області спектра (Ковальов В.М., 2001).