

ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

АЛІФОНОВА КІРА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 619:616.98:579.873.21

ДИСЕРТАЦІЯ

ЖУКИ-ШКІДНИКИ ЗЕРНОВИХ ЗАПАСІВ: РЕЗЕРВУАР ТА ЧИННИК
ПЕРЕДАЧІ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Галузь знань: 21 – Ветеринарна медицина

Спеціальність: 211 – Ветеринарна медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ К. В. Аліфонова

Науковий керівник:

Ткаченко Олексій Андрійович, доктор ветеринарних наук, професор
--

Зажарський Володимир Володимирович,
кандидат ветеринарних наук, доцент

Дніпро – 2023

АНОТАЦІЯ

Аліфонова К. В. «Жуки-шкідники зернових запасів: резервуар та чинник передачі мікобактерій туберкульозу». – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – «Ветеринарна медицина» – Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, 2023.

Наукова робота присвячена встановленню епізоотологічної ролі рисового довгоносика (*Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763), *Coleoptera*, *Curculionidae*) як потенційного резервуару *M. bovis* у процесі виникнення та поширення туберкульозу. Вивчено тривалість накопичення всередині організму комахи та виділення дисоціативної та патогенної форм мікобактерій туберкульозу в зовнішнє середовище довгоноси́ком. Визначено вплив пасажування через організм жука на морфологію та біологічні властивості (культуральні, тинкторіальні, біохімічні, вірулентні) збудника.

Питання туберкульозу є актуальним протягом багатьох років через активне поширення збудника інфекції по всьому світу, зокрема й в Україні. Нині це питання загострилось в Україні в зв'язку з бойовими діями, які спричинюють посилену міграцію тварин, як природню, так і штучну (евакуація), що становить потенційну загрозу, погіршує епізоотичну ситуацію та активує поширення зоонозів, зокрема туберкульозної інфекції.

У даній роботі дослідження проводили із використанням дисоціативних (117-а та 118 пасажі) і вірулентного (пасаж №100) штамів *M. bovis*, які зберігались у музеї кафедри інфекційних хвороб ДДАЕУ та отриманих із них субкультур. При отриманні субкультури визначали оптимальну температуру культивування збудника.

Встановили, що досліджувані штами мають стійкі властивості, які зберігаються при пересіві на свіже живильне середовище. Відмічали

пришвидщення появи первинного росту субкультур 100-го пасажу в 2,1 рази, 117-а пасажу в 1,1-1,3 рази, зниження прояву росту субкультури 118-го пасажу в 2,0-2,3 рази порівняно з вихідними культурами. В отриманих субкультурах визначили життєздатність мікобактерій шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць і з'ясували, що вони придатні для проведення наступних етапів експерименту.

Визначили, що для інфікування жуків необхідною концентрацією мікобактеріального завису є 1 мг в 1 см³ 0,9 % ізотонічного розчину натрію хлориду на кожні 10 г зерна пшениці, це забезпечує інфікування 100 % жуків, що утримуються на контамінованому субстраті.

Встановили здатність рисового довгоносика до механічного перенесення життєздатних мікобактерій на поверхні тіла. Дослідивши період носійства жуками збудника туберкульозу довели здатність до тривалого резервування мікобактерій у організмі комахи. Зокрема, у I серії експерименту при роботі з дисоціативним штамом протягом 50-ти діб виявляли збудник у гомогенізаті жуків та в змивах із поверхні тіла довгоносика з поступовим зниженням кількості мікробних клітин у полі зорі мікроскопа. При посіві гомогенізату інфікованих жуків на живильне середовище, прояв росту дослідних мікобактерій спостерігали лише до 30-ї доби після початку експерименту, що свідчить про втрату життєздатності мікобактерій після більш тривалого перебування в організмі жука. У II серії досліді при інфікуванні рисового довгоносика вірулентним штамом мікобактерій, у мазках і гомогенізаті з жуків виявляли збудник до 30-ї доби включно, а під час мікроскопії змивів із поверхні тіла – до 20-ї доби. Аналогічно до першої серії експерименту при посіві гомогенізату на живильне середовище – прояв росту спостерігали лише в пробірках, що були засіяні на 30-ту добу експерименту.

Дослідивши тривалість виділення мікобактерій та контамінацію об'єктів зовнішнього середовища рисовими довгоносиками з'ясували, що при інфікуванні дисоціативними формами *M. bovis* під час мікроскопічного дослідження суспензії з зерна виявляли до 12-ї доби досліді (до третьої

пересадки жуків), а на живильному середовищі ріст реєстрували протягом 30-ти діб після початку експерименту (тобто до п'ятої пересадки жуків). В експерименті з патогенним штамом у гомогенізаті з жуків мікобактерії виявлені аналогічно до 12-ї доби, а прояв росту на середовищі – до 20-ї доби після інфікування. За морфологією та культуральними властивостями виділений упродовж двох серій експерименту збудник був ідентичним до вихідної культури.

На кожному етапі експерименту виділені культури проходили молекулярно-генетичну ідентифікацію з підтвердженням видової належності. Генотипізацію культур проведено з використанням VNTR-методу. Доведено, що довжина фрагментів ампліконів отриманих в результаті ПЛР із праймерами, що направлені на цільові VNTR-локусу є ідентичною зі штамми *M. bovis* в усіх дослідних зразках. Пасажування збудника через організм рисового довгоносика не спричинило зміну геному, які можна ідентифікувати методом VNTR-генотипування, тобто кількість тандемних повторів у варіабельних локусах залишилась без зміни.

Порівнюючи морфологію та біологічні властивості мікобактерій вихідного штаму та культур отриманих після пасажування через організм жуків вирішили, що відмінністю є збільшення періоду появи первинного росту на живильному середовищі 1 зниження інтенсивності росту. Морфологія та тинкторіальні властивості залишались без змін.

Досліджуючи біохімічні властивості дослідних культур встановили, що пасажування мікобактерій через рисового довгоносика сприяє збільшенню ферментативної активності. У дисоціативних форм (пасаж №118) відмічали підвищення активності дегідрогенази та нітратредуктази. У вірулентного штаму спостерігали більш стійкий геном, прояв біохімічної активності був слабким у вихідної культури, але після тривалого перебування збудника в організмі жука відмічали лише незначне підвищення активності нітратредуктази (через 12 діб після інфікування) та дегідрогенази (через 20 діб), що свідчить про активізацію механізмів захисту мікробної клітини та її адаптації до нових умов існування.

Оцінюючи життєздатність виділених культур спостерігали тенденційне зниження кількості колонієутворюючих одиниць з кожною пересадкою жуків, у експерименті з дисоціативним штамом на 5,03% (культура виділена з суспензії з зерна на 4-ту добу досліджу) – 97,53 % (на 30-ту добу) та на 73,85 % порівняно з вихідним штамом у культурах з гомогенізату жуків на 30-ту добу. У II серії досліджу (пасаж №100) – на 9,3% (на 4-ту добу) – 96,2% (на 20-ту добу) та на 62,8% у культурі з гомогенізату жуків на 30-ту добу.

Встановили вплив рисового довгоноса на вірулентні властивості мікобактерій методом проведення біологічної проби в експерименті на мурчаках. При проведенні біопроб культурми дисоціативних форм не спостерігали жодних клінічних ознак у дослідних тварин, протягом всього експерименту (90 діб) мурчаки набирали вагу. Після евтаназії проведено патологоанатомічний розтин, у внутрішніх органах та лімфатичних вузлах характерні зміни відсутні. У мазках-відбитках забарвлених за методом Ціля-Нільсена виявлено дослідні форми мікобактерій у всіх групах, посів суспензії на живильне середовище зумовлював ріст характерних колоній, що доводить персистенцію мікобактерій в організмі лабораторних тварин та виникнення доброякісного інфекційного процесу. Внутрішньом'язове інфікування мурчаків вірулентним штамом призводило до динамічного зниження маси тіла з 28-35-ї доби після інфікування, в місці інфікування відмічали формування виразки на 20-ту добу після введення завису з наступним проривом (через 8-11 діб), проведення алергічної проби зумовлювало гіперемію шкіри та утворення виразки, загибель лабораторних тварин спостерігалась на $43,0 \pm 2,6$ - $64,0 \pm 3,0$ добу. При патологоанатомічному розтині відмічали характерні яскраво виражені зміни у внутрішніх органах та пахвинних лімфатичних вузлах. Найбільш патогенними виявились культури, що отримані з суспензії зерна на 12-ту добу експерименту, індекс ураження в тварин цієї групи зростав до $23,0 \pm 5,3$ балів. При мікроскопії мазків-відбитків спостерігали дослідні мікобактерії в внутрішніх органах мурчаків всіх експериментальних груп.

Після пасажування 100-го пасажу через жука збудник набув більшої патогенності через 12 діб перебування в організмі рисового довгоносика, загибель спостерігалась на 17,3% швидше порівняно з вихідним штамом, а індекс ураження зростав з $19,0 \pm 3,0$ до $27,3 \pm 0,6$ балів, однак при більш тривалому перебуванні збудника в організмі довгоносика мікобактерії поступово зменшували агресивність.

При аліментарному інфікуванні мурчаків методом згодовування зерна на якому утримувались дослідні жуки протягом експерименту встановили, що лабораторні тварини набирали вагу до 49-56-ї доби, пізніше відмічалось зниження маси тіла. Загибель тварин спостерігали на 72-90-ту добу. Реакцію на введення ППД-туберкуліну відмічали лише на 60-ту та 90-ту добу. При розтині основною локалізацією патологоанатомічних змін була печінка, легені містили поодинокі осередки казеозних уражень. У кишечнику фіксували гіперемію судин.

Шматочки уражених органів досліджували гістологічно. У легенях спостерігали виражений набряк, масивні зливні лімфоїдно-макрофагальні інфільтрати з наявністю периваскулярних лімфоїдних інфільтратів, відмічали ділянки підвищеної та зниженої повітряності. У селезінці спостерігали наявність масивних полів казеозного некрозу, серед тканин – багато гранульом з лімфоїдно-макрофагальною інфільтрацією та наявністю гігантські клітини типу Пирогова-Лангханса. Тканина лімфатичного вузла повністю некротизована, потовщено капсула інфільтрована лімфоцитами та макрофагами.

Результати дисертаційної роботи можна використовувати в науково-дослідницькій роботі кафедр та в освітньому процесі для підготовки фахівців зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина», при виділенні мікобактерій туберкульозу в науково-дослідних установах і плануванні заходів діагностики, боротьби та профілактики туберкульозу в господарствах та в зерносховищах.

Ключові слова: мікобактерії, *M. bovis*, рисовий довгоносик, туберкульоз, мурчаки, ПЛР-дослідження, біопроба, гістологія, легені, печінка, мікроскопія, тварини, морфологія, селезінка, біологічні властивості, мікроорганізми

ABSTRACT

Alifonova K. V. "Beetles-pests of grain stocks: a reservoir and a factor of transmission of mycobacteria tuberculosis" - Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 211 - Veterinary Medicine" - Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, 2023.

The scientific work is devoted to the establishment of the epizootological role of rice weevil (*Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763), *Coleoptera*, *Curculionidae*) as a potential reservoir of *M. bovis* in the process of emergence and spread of tuberculosis. The duration of accumulation inside the insect body and the release of dissociative and pathogenic forms of mycobacteria tuberculosis into the environment by the weevil was studied. The effect of passage through the organism of the weevil on the morphology and biological properties (culture, tinctorial, biochemical, virulence) of the pathogen was determined.

The issue of tuberculosis has been relevant for many years due to the active spread of the infectious agent around the world, including in Ukraine. Currently, this issue has become more acute in Ukraine due to the hostilities, which cause increased migration of animals, both natural and artificial (evacuation), which poses a potential threat, worsens the epizootic situation and activates the spread of zoonoses, including tuberculosis infection.

In the present study, the research was conducted using dissociative (117 and 118 passages) and virulent (passage №100) strains of *M. bovis* stored in the museum of the Department of Infectious Diseases of the State Academy of Environmental Health and the subcultures obtained from them. The optimal temperature of cultivation of the pathogen was determined upon obtaining the subculture.

It was found that the studied strains have stable properties that are preserved when inoculated into fresh culture medium. The acceleration of the primary growth of subcultures of the 100th passage by 2.1 times, 117th passage by 1.1-1.3 times, and a decrease in the growth of subculture 118th passage by 2.0-2.3 times compared to the

original cultures were noted. The viability of mycobacteria was determined in the obtained subcultures by counting colony-forming units and found that they were suitable for the next stages of the experiment.

It was determined that the required concentration of mycobacterial suspension for infection of beetles is 1 mg per 1 cm³ of 0.9% isotonic sodium chloride solution for every 10 g of wheat grain, which ensures infection of 100% of beetles kept on the contaminated substrate.

The ability of the rice weevil to mechanically transfer viable mycobacteria on the body surface was determined. By studying the period of carriage of the tuberculosis pathogen by the beetles, we proved the ability to store mycobacteria in the insect's body for a long time. In particular, in the first series of the experiment, when working with a dissociative strain for 50 days, the pathogen was detected in the homogenized beetle fluid and in the flushes from the surface of the weevil's body with a gradual decrease in the number of microbial cells in the microscope field of view. When sowing the homogenized homogenate of infected beetles on the nutrient medium, the growth of the experimental mycobacteria was observed only by day 30 after the start of the experiment, indicating a loss of viability of mycobacteria after a longer stay in the beetle's body. In the second series of the experiment, when rice weevil was infected with a virulent strain of mycobacteria, the pathogen was detected in smears and homogenized beetle fluid up to day 30 inclusive, and during microscopy of body surface washings - up to day 20. Similarly to the first series of the experiment, when the homogenized material was inoculated on the culture medium, growth was observed only in the tubes inoculated on the 30th day of the experiment.

After studying the duration of mycobacterial isolation and contamination of environmental objects by rice weevils, it was found that during infection with dissociative forms of *M. bovis*, during microscopic examination, grain suspensions were detected by day 12 of the experiment (up to the third transplantation of beetles), and growth on the nutrient medium was recorded within 30 days after the start of the experiment (i.e., up to the fifth transplantation of beetles). In the experiment with the pathogenic strain, mycobacteria were detected in the homogenized beetle homogenate

similarly up to day 12, and growth on the medium was detected up to day 20 after infection. In terms of morphology and culture properties, the pathogen isolated during the two series of the experiment was identical to the original culture.

At each stage of the experiment, the isolated cultures were subjected to molecular genetic identification with confirmation of species affiliation. Genotyping of the cultures was performed using the VNTR method. It was proved that the length of amplicon fragments obtained as a result of PCR with primers targeting the VNTR locus was identical to the *M. bovis* strains in all the experimental samples. The passage of the pathogen through the rice weevil organism did not cause genome changes that can be identified by VNTR genotyping, i.e., the number of tandem repeats in the variable loci remained unchanged.

Comparing the morphology and biological properties of mycobacteria of the original strain and cultures obtained after passage through the beetle organism, it was decided that the difference was an increase in the period of primary growth on the nutrient medium and a decrease in growth intensity. The morphology and tintorial properties remained unchanged.

Investigating the biochemical properties of the experimental cultures, it was found that the passage of mycobacteria through the rice weevil increases enzymatic activity. In dissociative forms (passage №118), an increase in the activity of dehydrogenase and nitrate reductase was observed. A more stable genome was observed in the virulent strain, the manifestation of biochemical activity was weak in the initial culture, but after a long stay of the pathogen in the beetle's body, only a slight increase in the activity of nitrate reductase (12 days after infection) and dehydrogenase (20 days) was noted, indicating the activation of the defense mechanisms of the microbial cell and its adaptation to new conditions of existence.

Evaluating the viability of the isolated cultures, we observed a tendency to decrease the number of colony-forming units with each transplantation of beetles, in the experiment with the dissociative strain by 5.03% (culture isolated from a suspension of grain on the 4th day of the experiment) - 97.53% (on the 30th day) and by 73.85% compared to the original strain in cultures from beetle homogenate on the

30th day. In the second series of the experiment (passage №100) - by 9.3% (on the 4th day) - 96.2% (on the 20th day) and by 62.8% in the culture from the beetle homogenizer on the 30th day.

The effect of rice weevil on the virulence of mycobacteria was determined by conducting a biological test in an experiment on ants. During the bioassay with cultures of dissociative forms, no clinical signs were observed in the experimental animals, and during the entire experiment (90 days), the marmosets gained weight. After euthanasia, a pathological examination was performed, and there were no characteristic changes in the internal organs and lymph nodes. In the smears stained by the Ziehl-Nielsen method, experimental forms of mycobacteria were detected in all groups; sowing the suspension on the nutrient medium caused the growth of characteristic colonies, which proves the persistence of mycobacteria in the body of laboratory animals and the occurrence of a benign infectious process. Intramuscular infection of mice with a virulent strain led to a dynamic decrease in body weight from 28-35 days after infection, ulceration was observed at the site of infection on the 20th day after injection of the suspension with subsequent breakthrough (after 8-11 days), allergic test caused skin hyperemia and ulceration, death of laboratory animals was observed on 43.0 ± 2.6 - 64.0 ± 3.0 days. At the pathological autopsy, characteristic pronounced changes in the internal organs and inguinal lymph nodes were noted. The most pathogenic were the cultures obtained from the grain suspension on the 12th day of the experiment, the lesion index in animals of this group increased to 23.0 ± 5.3 points. Microscopy of smear-prints revealed experimental mycobacteria in the internal organs of the pigs of all experimental groups.

After passage of the 100th passage through the beetle, the pathogen became more pathogenic after 12 days of stay in the body of the rice weevil, death was observed 17.3% faster compared to the original strain, and the lesion index increased from 19.0 ± 3.0 to 27.3 ± 0.6 points, but with a longer stay of the pathogen in the body of the weevil, mycobacteria gradually reduced their aggressiveness.

In the case of alimentary infection of ants by feeding grain on which the experimental beetles were kept during the experiment, it was found that laboratory

animals gained weight up to 49-56 days, later a decrease in body weight was noted. The death of animals was observed on the 72-90th day. The reaction to the administration of PPD-tuberculin was observed only on the 60th and 90th day. At necropsy, the main localization of pathological changes was the liver, the lungs contained single foci of caseous lesions. Vascular hyperemia was recorded in the intestine.

Pieces of the affected organs were examined histologically. In the lungs, there was severe edema, massive confluent lymphoid-macrophage infiltrates with the presence of perivascular lymphoid infiltrates, areas of increased and decreased airiness were noted. In the spleen, there were massive fields of caseous necrosis, many granulomas with lymphoid-macrophage infiltration and the presence of giant Pirogov-Langhans cells among the tissues. The tissue of the lymph node is completely necrotized, the thickened capsule is infiltrated with lymphocytes and macrophages.

The results of the dissertation can be used in the research work of the departments and in the educational process for the training of specialists in the specialty 211 "Veterinary Medicine", in the isolation of mycobacteria of tuberculosis in research institutions and planning measures for the diagnosis, control and prevention of tuberculosis in farms and granaries.

Key words: mycobacteria, *M. bovis*, rice weevil, tuberculosis, guinea pigs, PCR research, biological test, histology, lungs, liver, microscopy, animals, morphology, spleen, biological properties, microorganisms.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Наукові праці, в яких опубліковано основні результати дисертації:

1.1. Статті у фахових виданнях України:

1. **Аліфонова К. В.** (2021). Комахи – чинник передачі мікобактерій туберкульозу (оглядова стаття). Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування, 7, 7-11. <https://doi.org/10.31890/vttp.2021.07.01> (Здобувач провела дослідження та підготувала статтю до друку).

2. Зажарський, В. В., & **Аліфонова, К. В.** (2022). Особливості інфікування жуків мікобактеріями та їх вплив на життєздатність збудника. Scientific Progress & Innovations, 2(2), 248-255. <https://doi.org/10.31210/visnyk2022.02.29> (Здобувач провела дослідження та підготувала статтю до друку).

1.2. Статті у наукових виданнях, включених до наукометричних баз даних Web of Science, Scopus

3. Tkachenko, O., **Alifonova, K.**, Gavrylina, O., & Knight, A. (2021a). Epizootological significance of rice weevil as a Mycobacterium bovis reservoir. Scientific Horizons, 24(3), 28-37. [https://doi.org/10.48077/scihor.24\(3\).2021.28-37](https://doi.org/10.48077/scihor.24(3).2021.28-37) (Здобувач провела дослідження та підготувала статтю до друку). Q4

4. Zazharskyi, V., **Alifonova, K.**, Bilan, M., Kozak, N., & Kasianenko, O. (2022). Influence of Sitophilus oryzae on biological properties of Mycobacterium bovis. Scientific Horizons, 25(11), 20-30. [https://doi.org/10.48077/scihor.25\(11\).2022.20-30](https://doi.org/10.48077/scihor.25(11).2022.20-30) (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті). Q4

5. Zazharskyi, V. V., **Alifonova, K. V.**, Brygadyrenko, V. V., Zazharska, N. M., Goncharenko, V. P., Solomon, V. V. (2023). The ability of Sitophilus oryzae (Coleoptera, Curculionidae) to transmit Mycobacterium bovis: Morphology, cultural biochemical properties of the bacteria. Regul. Mech. Biosyst., 2023, 14(3), 511-523. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

2. Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. **Аліфонова, К. В.** (2020). Жуки – резервуар мікобактерій туберкульозу. Матеріали II міжнародної науково-практичної конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку науки та освіти» Львів, 15-16 вересня 2020 року, С. 5-6

7. **Аліфонова, К. В.** (2021). Роль комах у процесі поширення мікобактерій. Збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції «Проблеми та перспективи розвитку науки, освіти та суспільства в XXI столітті» Полтава, 23 вересня 2021 року, С. 48-49

8. **Kira Alifonova, & Volodymyr Zazharskyi** (2021). Effects of low temperature on the weight of guinea pigs. Book of Abstracts 2nd INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY CONFERENCE FOR YOUNG RESEARCHERS Sustainable Development Trends and Challenges under COVID-19. Sumy, November 29-30, p. 30-31

9. **Alifonova K., & Zazharskyi V.** (2022). The influence of the rice weevil on the pathogenicity of Mycobacterium bovis. Book of Abstracts SUSTAINABLE DEVELOPMENT IN WARTIME UKRAINE AND THE WORLD. Prague, Czech Republic, November 25, p. 8-9

2. 1. Науково-практичні рекомендації:

10. **Аліфонова К.В., & Зажарський В.В.** (2023). Науково-практичні рекомендації. Методика експериментального інфікування комах збудником туберкульозу. Дніпро, 27 (*Дисертантка узагальнила власні лабораторні нароби, загальновідомі дані, підготувала і оформила матеріали для методичних рекомендацій*).

Зміст

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	17
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	24
1. Загальні поняття про мікобактерії, їх значення	24
1.2. Номенклатура та класифікація мікобактерій	25
1.3. Морфологія, біологічні та культуральні властивості мікобактерій	29
1.4. Епізоотологічні особливості туберкульозу	32
1.5. Морфологія та біологічні особливості та методи дослідження жуків	37
1.6. Діагностика туберкульозу	38
1.7. Висновок з огляду літератури	43
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи	45
2.1. Місце проведення досліджень	45
2.2. Матеріали дослідження	47
2.3. Методи досліджень	47
2.3.1. Бактеріологічне дослідження	47
2.3.2. Біохімічне дослідження	48
2.3.3. Визначення життєздатності мікобактерій	50
2.3.4. ПЛР-дослідження	51
2.3.5. Інфікування жуків	54
2.3.6. Біологічне дослідження	59
РОЗДІЛ 3. Результати дослідження	62
3.1. Морфологічні особливості та біологічні властивості мікобактерій	62
3.1.1. Морфологія, тинкторіальні властивості дослідних культур	62
3.1.2. Ферментативні властивості дослідних штамів;	67
3.1.3. Визначення життєздатності дослідних культур;	68
3.2. Ідентифікація мікрофлори рисового довгоносика	70
3.3. Експериментальне інфікування рисового довгоносика мікобактеріями дослідних штамів	72
3.3.1. Визначення оптимальної дози для інфікування жуків;	72

3.3.2. Інфікування жуків:	74
3.3.2.1. . Встановлення здатності рисового довгоносика до механічного перенесення мікобактерій	75
3.3.2.2. Визначення тривалості мікробоносійства жуками (тривалість перебування збудника в організмі рисового довгоносика)	76
3.3.2.3. Визначення тривалості виділення жуками мікобактерій та контамінації об'єктів зовнішнього середовища	86
3.3.3. ПЛР-дослідження виділених культур	90
3.4. Визначення впливу рисового довгоносика на біологічні властивості мікобактерій	94
3.4.1. Визначення морфології, тинкторіальних, культуральних властивостей мікобактерій виділених з організму жуків та контамінованого ними зерна	95
3.4.2. Ферментативна активність мікобактерій отриманих після пасажування через організм рисового довгоносика	98
3.4.3. Визначення життєздатності мікобактерій виділених після пасажування через організм рисового довгоносика	103
3.5. Визначення ступеня вірулентності мікобактерій вихідного патогенного та дисоціативного штамів і культур отриманих після пасажування через організм жуків	107
3.5.1. Дослідження вірулентності материнського штаму та дисоціативних форм <i>M. bovis</i> у динаміці досліду на жуках	107
3.5.2. Дослідження вірулентності <i>M. bovis</i> шляхом аліментарного інфікування лабораторних тварин у динаміці досліду на жуках	121
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	127
ВИСНОВКИ	139
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	142
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	143
ДОДАТКИ	163

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ГР⁺ – грампозитивні мікроорганізми

ГР⁻ – грамнегативні мікроорганізми

ДНК – дезоксирибонуклеїновая кислота

КУО – колонієутворюючі одиниці

МО – міжнародні одиниці

МПА – м'ясо-пептонний агар

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон

П.н. – пара нуклеотидів

ППД –protein purified derivativate

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ТБ – туберкульоз

DNA – deoxyribonucleic acid

pH – від'ємний десятковий логарифм концентрації іонів водню

VNTR – variable number tandem repeats

ВСТУП

Актуальність теми. Проблема туберкульозу є широко поширеною як в Україні, так і за її межами. Туберкульоз посідає провідне місце серед усіх зоонозних хвороб, становить епізоотологічну та епідеміологічну небезпеку та завдає значні економічні збитки.

Основними причинами є надзвичайна стійкість мікобактерій до дії фізико-хімічних факторів за рахунок вмісту ліпідів у клітинній стінці, висока здатність до адаптації у навколишньому середовищі та мінливості, складна будова мікробної клітини та здатність мікобактерій проникати в організм тварини різними шляхами, як через дихальний і травний тракти, так і через слизові оболонки статевих органів та шкіри, кон'юнктиву, внутрішньоутробно, і виділятися з харкотинням, фекаліями, молоком, рідше зі спермою та сечею.

Питання вивчення біологічних властивостей мікобактерій залишається актуальним і сьогодні. Мікобактерії завдяки здатності до мінливості можуть існувати в декількох морфологічних формах, що ускладнює їх виявлення та ідентифікацію. В організмі тварин збудник може зберігатися як в класичній формі, викликаючи клінічний прояв розвитку захворювання, так і у вигляді дисоціативних та L-форм, коли типові клінічні та патолого-анатомічні зміни відсутні, проте тварина є джерелом збудника хвороби (Ткаченко О.А. і ін., 2010, Завгородній А.І. і ін., 2014б).

Останнім часом закордонні вчені-епізотологи почали спостерігати мікобактерії в зернових культурах кормових сумішей (Matlova L. et al., 2003). У наукових виданнях все частіше з'являються повідомлення щодо виділення мікобактерій з організму різноманітних безхребетних, зокрема з дощових хробаків та двокрилих (Fisher O. et al., 2003a; 2004b; 2006).

Аналізуючи існуючі дані можна припускати, що комахи, зокрема жуки-шкідники зернових культур можуть бути резервуаром мікобактерій туберкульозу, приймати участь в розповсюдженні збудника на велику відстань та його передачу сприйнятливим організмам.

Розробка ефективних методів діагностики, профілактики та повної ліквідації інфекції неможливе без досконалого володіння інформацією щодо шляхів зараження тварин туберкульозом, шляхів виділення збудника з організму хворої тварини або носія, передачі інфекції, резервуарів збудника.

У зв'язку з цим наведені матеріали роблять актуальною тему даного дослідження, вказують на необхідність та важливість встановлення ролі жуків-шкідників зернових запасів у процесі розповсюдження туберкульозу. З'ясування даних питань сприятиме більш поглибленому вивченню шляхів поширення інфекції, що допоможе вирішенню питання боротьби з туберкульозом в Україні.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планами науково-дослідних робіт кафедри інфекційних хвороб тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету «Розробити систему профілактики та боротьби з туберкульозом тварин, який викликаний швидкорослими штамми *M. bovis*, *M. avium* та їх дисоціативними формами» (2010 – 2020 рр.), номер державної реєстрації – 0110U002413. «Вивчення епізоотологічних особливостей мікобактеріальних інфекцій та з'ясування біологічних властивостей їх збудників, вдосконалення засобів профілактики та боротьби з ними» (2021–2025 рр.), номер державної реєстрації – 0121U109321.

Мета і завдання. Мета роботи - встановити епізоотичну роль жуків-шкідників зернових запасів у поширенні туберкульозу та з'ясувати зміни біологічних властивостей *M. bovis*.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- провести поглиблене вивчення морфології та біологічних властивостей музейного вірулентного штаму *M. bovis* та дисоціативних форм і отриманих субкультур;
- розробити методику інфікування комах, з'ясувати здатність до експериментального зараження рисового довгоносика мікобактеріями;
- визначити здатність жука до механічного перенесення збудника;

- визначити вплив на геном мікобактерій після проходження через організм рисового довгоносика;
- встановити вплив рисового довгоносика на морфологію та біологічні властивостей *M. bovis* після пасажів через організм жуків;
- визначити епізоотологічне значення жуків, заражених музейними штамами *M. bovis* у виникненні та поширенні туберкульозу.

Об'єкт дослідження – епізоотична роль жуків-шкідників у поширенні туберкульозу.

Предмет дослідження – музейні штами *M. bovis* (100-й пасаж), дисоціативні форми (117-а та 118 пасаж), мікобактерії виділені з організму рисового довгоносика, морфологія, тинкторіальні та культуральні властивості, біохімічна активність.

Методи дослідження: аналітичні (аналіз спеціальної наукової літератури), бактеріологічні (мікроскопічні та культуральні дослідження), біохімічні (визначення каталазної, пероксидазної дегідрогеназної, нітратредуктазної активності, здатності до гідролізу ТВІН-80), біологічна проба в експерименті на мурчаках, патологоанатомічні (визначення макроскопічних змін), гістологічні та ПЛР-дослідження, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Доведена потенційна здатність рисового довгоносика до розповсюдження мікобактерій туберкульозу. Вперше розроблена та дослідно підтверджена методика аліментарного інфікування комах збудником, визначена необхідна концентрація мікобактерій для зараження 100 % жуків. Підтверджена здатність комах, зокрема рисового довгоносика до механічного перенесення збудника, резервування мікобактерій у своєму організмі з наступним виділенням їх у навколишнє середовище та контамінацію зовнішніх об'єктів. Визначена тривалість накопичення мікобактерій в організмі жука та термін підтримки життєздатності збудника.

За допомогою бактеріологічних досліджень та ПЛР-аналізу встановлено, що збудник не змінює свій геном після пасажування через організм жука, а також зберігає свою морфологію, культуральні та тинкторіальні властивості.

Визначено, що для адаптації в організм рисового довгоносіка мікобактерії здатні до активізації механізмів захисту мікробної клітини шляхом зміни своєї ферментативної активності. Зокрема, спостерігали підвищення активності дегідрогенази та нітратредуктази.

Після проходження через жуків мікобактерії знижують свою життєздатність, але збудник здатен зумовлювати інфекційний процес у лабораторних тварин.

За допомогою біологічного дослідження в експерименті на мурчаках визначено, що пасажування через організм довгоносіка не призводить до відновлення вірулентних властивостей дисоціативних форм *M. bovis*. Пасажування патогенного штаму (100-й пасаж) призводить до варіації ступеня патогенності. Найвищого ступеня патогенності мікобактерії набувають після 12-ти діб в організмі рисового довгоносіка.

У дисертаційній роботі вирішено актуальну наукову проблему, яка полягає у встановленні резервуарів збудника туберкульозу. Обґрунтовано роль комах, зокрема рисового довгоносіка, у процесі розповсюдження та передачі збудника інфекції. У роботі науково обґрунтовано значення комах у поширенні туберкульозу, розроблено методику їх інфікування та дослідження.

Практичне значення одержаних результатів. полягає у використанні результатів і висновків проведених досліджень у практичній діяльності епізоотологів і паразитологів; використання матеріалів дослідження в науково-дослідних роботах та в процесі підготовки навчальних і методичних посібників для викладання у вищих навчальних закладах; у процесі організації та планування обґрунтованих профілактичних заходів боротьби з туберкульозом. Розроблену методику аліментарного інфікування комах доцільно використовувати під час наукових досліджень у зв'язку з доступністю проведення експерименту.

Дані щодо здатності рисового довгоносіка до розповсюдження туберкульозу дає підстави до використання отриманих результатів у розробці профілактичних заходів щодо туберкульозної інфекції.

Результати дисертаційної роботи використовуються в освітньому процесі та науково-дослідній роботі викладачів і студентів спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» на кафедрі інфекційних хвороб тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету; кафедрі епізоотології та інфекційних хвороб Білоцерківського національного аграрного університету; кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогігієни та безпеки і якості продуктів тваринництва Сумського національного аграрного університету; кафедрі епізоотології, мікробіології і вірусології Національного університету біоресурсів і природокористування України; кафедрі епізоотології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С. З. Гжицького, кафедрі мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології Поліського національного університету.

Особистий внесок здобувача. Здобувач самостійно опрацювала та провела аналіз наукової літератури з напряму досліджень, освоїла методи та виконала весь запланований обсяг експериментальних досліджень, їх статистичну обробку, узагальнила одержані результати, сформулювала висновки та пропозиції виробництву. Разом з науковим керівником сформульовано тему, мету та завдання роботи, сплановано експериментальні дослідження, проведено аналіз одержаних результатів.

Апробація результатів дисертації. Матеріали наукової роботи доповідались та обговорювались на міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми та перспективи розвитку науки, освіти та суспільства в XXI столітті» (Полтава, 23 вересня 2021 р.); на IX міжнародній науково-практичній конференції «Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування» (Львів, 19-22 вересня 2021 р.); на міжнародній науково-практичній конференції «Наукові пошуки молоді у XXI столітті «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (Біла Церква, 18 листопада 2021 р.); 2nd international multidisciplinary conference for young researchers Sustainable Development Trends and Challenges under COVID-19. (Sumy, November 29-30); Development project “Enhancement of the. PhD students potential for qualitative

research in Ukraine: Sustainable development in wartime ukraine and the world” (Prague, Czech Republic, November 25).

Публікації. Основний зміст дисертаційної роботи викладено у 10 наукових працях, із яких 2 опубліковано у фахових виданнях України, 3 – у періодичних наукових виданнях, включених до наукометричних баз даних Scopus, 4 – тези наукових доповідей у збірниках матеріалів конференції, 1 – науково-практичні рекомендації.

Структура та обсяг дисертації. Основний зміст дисертації викладений на 141 сторінках комп’ютерного тексту, проілюстрований 13 таблицями та 43 рисунками. Робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел літератури, що складається із 172 найменувань, у тому числі 107 – латиницею та 8 додатків.

Розділ 1. Огляд літератури

1.1. Загальні поняття про мікобактерії, їх значення

Проблема виникнення туберкульозу є актуальною для більшості країн світу, зокрема дане захворювання широко поширене в Україні (Кассіч і ін., 2014). Ляхович і ін. (2018) вказують, що наша держава посідає друге місце серед усіх Європейських країн за чисельністю захворюваності на туберкульоз серед населення. На сьогоднішній день, туберкульоз входить в десятку найпоширеніших епідеміологічних причин загибелі людей в світі (Jelińska et al., 2020). За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я латентно інфікованими є третина населення, а туберкульоз входить в рейтинг десяти провідних причин смерті. Сьогодні глибоко вивчається питання розробки протитуберкульозних препаратів для боротьби з інфекцією (Bihdan et al., 2018; Gotsulya et al., 2020; Hotsulia et al., 2021). Зокрема, особливу увагу приділяють вивченню антибактеріальної активності рослинних екстрактів та похідних 1,2,4-тріазол-3-тіолів (Palchykov et al., 2019; Zazharskyi et al., 2019, 2020).

Туберкульоз – небезпечне антропозоонозне захворювання, для якого характерним є утворення туберкулів (специфічних вузликів), які схильні до заплнування й сирнистого розпаду в легенях, кишечнику та інших органах і тканинах (Каришева, 2002).

Туберкульоз несе надзвичайно високу епізоотологічну та епідеміологічну небезпеку, завдає високі економічні збитки, які виникають внаслідок зниження продуктивності тварин та погіршення якості тваринницької продукції, вимушеного забою тварин та утилізації трупів, зниження кількості та якості тваринницької продукції, проведення ветеринарно-санітарних заходів у неблагополучних щодо туберкульозу господарствах та організацію оздоровчих заходів в них (Ткаченко і ін., 2013; Горжеєв, 2014).

Туберкульоз був відомий людству ще до нашої ери. Наслідки його перебігу можна бачити навіть у єгипетських мумій (Zink et al., 2001). Гіппократ у своїх роботах описував дане захворювання характеризуючи його кашлем,

лихоманкою, високою втомлюваністю, відхаркуванням крові. У II столітті нашої ери Гален встановив, що захворювання є контагіозним. Французький вчений Рене Лаеннен намагався діагностувати туберкульоз, реєструючи зміни в легенях хворих людей, а у 1819 році він запровадив термін «туберкульоз» у медичну термінологію. Туберкульоз, як окреме інфекційне захворювання, довів Villemain в 1865 році, шляхом зараження тварин матеріалом взятим від людських трупів.

Вперше встановити, що збудником захворювання є мікобактерії вдалося німецькому вченому Роберту Коху в 1882р., про що він повідомив 24 березня в м. Берлін. Внаслідок чого на честь Р. Коха збудник назвали «паличкою Коха», а сам вчений отримав Нобелівську премію. На сьогоднішній день відомо більше 100 видів мікроорганізмів, які відносяться до роду *Mycobacterium*, але їх кількість продовжує збільшуватися. Різні види мікобактерій суттєво відрізняються між собою за видовою специфічністю макроорганізму, ступенем патогенності, морфологією, біологічними та культуральними властивостями (Каришева, 2002; Katoch, 2004)

1.2. Номенклатура та класифікація мікобактерій

Типізація мікобактерій ґрунтується на морфології мікроорганізмів, їх культуральних та біохімічних властивостях, медикаментозній чутливості, на характеристиці їх ДНК, тобто за фенотиповими та генотиповими ознаками.

Мікобактерії займають проміжне місце між бактеріями та актиноміцетами. Згідно сучасної номенклатури збудник туберкульозу відноситься до типу *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales*, родини *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium*. Новий рід в систематику включили німецькі вчені-мікробіологи К. В. Lehman R. Neumann в 1896 році (Головко і ін., 2016).

Усі види мікобактерій можливо поділити на 2 групи: патогенні для тварин та людини та умовно-патогенні. Мікобактерії, які викликають туберкульоз об'єднані в комплекс *Mycobacterium tuberculosis complex*, який включає в себе: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae*,

Mycobacterium microbi, *Mycobacterium pinnipedii*, комплекс *Mycobacterium avium* complex, а саме *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Mycobacterium avium silvaticum*, *Mycobacterium colombiense*.

Умовно-патогенні мікобактерії (інші назви: нетуберкульозні або атипові мікобактерії), які викликають захворювання з групи мікобактеріозів, для яких є характерними ураження різноманітних органів, але переважно з локалізацією в органах дихальної системи. Характеристика атипових мікобактерій описані в роботах багатьох як вітчизняних, так і закордонних вчених. Атипові мікобактерії відрізняються від патогенного збудника за вірулентністю для макроорганізму, за біохімічними та культуральними властивостями. Особливістю мікобактеріозів є надзвичайно висока кількість збудників у зовнішньому середовищі, які відносяться до групи нетуберкульозних мікобактерій (French et al., 1997; Ткаченко, 1999; Касіч і ін., 2001; Касіч і ін., 2003).

Представники атипових мікобактерій надзвичайно широко поширені у навколишньому середовищі (воді, ґрунті). Зумовлюють сенсibilізацію макроорганізму до туберкульозу, ускладнюючи при цьому діагностичну оцінку проби після проведення алергічного дослідження (туберкулізації), спричиняючи псевдоалергічну реакцію. Для диференціації збудників тваринам проводять симультанну алергічну пробу на туберкульоз із застосуванням протеїн пурифід дериват-туберкуліну (ППД-туберкуліну) для ссавців і алерген з атипових мікобактерій (ААМ), що дозволяє знизити необґрунтований забій більше 1000 голів здорових тварин (Ткаченко, 1998; Heifets, 2004; Завгородній і ін., 2014; Завгородній & Котляр, 2014в;).

Основними представниками даної групи є: *Mycobacterium Kansasii*, що міститься у навколишньому середовищі, викликає ураження легень, проте перебіг менш бурхливий, ніж за туберкульозу, рідше уражається шкіра та м'які тканини; *Mycobacterium ulcerans*, що міститься також у навколишньому середовищі, характерним є виникнення виразок на шкірі, *Mycobacterium xenopi* – уражує сечостатеву систему та шкіру, *Mycobacterium avium intracellulare* –

викликає ураження шкірних покривів, м'язової тканини, кісткового скелету (Wolinsky, 1992).

Е.Н. Runyon і А. Timple в 1954 році запропонували варіант класифікації атипичних мікобактерій, сьогодні відому як класифікація Раньона. Згідно даної класифікації мікобактерії розділяють на 4 групи залежно від швидкості росту, морфології колоній і здатності до пігментоутворення (жовті каротиноїди) за наявності або відсутності світла (Timpe & Runyon, 1954; Runyon, 1959).

Перші три групи відносять до повільноростучих мікобактерій, яким для прояву росту необхідно 30-90 днів. Надалі класифікація відбувається відповідно до здатності мікобактерій продукувати пігмент.

Перша група – фотохромогенні мікобактерії. Вони продукують пігмент під впливом світла. До цієї групи відносяться *Mycobacterium Kansisii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium intermedium*. Мікобактерії першої групи зазвичай проявляють ріст впродовж від 10-15 до 20-30 діб. Дані види мікобактерій проявляють ріст як у вигляді S-форм, так і у вигляді R-форм (Яворська & Сибірна, 2009).

Друга група – скотохромогенні мікобактерії. Вони можуть продукувати пігмент як під дією світла, так і без світла, набуваючи помаранчевого відтінку. Представниками скотохромогенів є *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium xenopi*. Мікобактерії другої групи починають рости вже на 10-20 добу, зазвичай, це гладенькі, блискучі колонії.

Третя група – нефотохромогенні (непігментовані) – мікобактерії, які не здатні продукувати пігменти. До цієї групи належать *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium mulcerans*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium genavense*. Мікобактерії третьої групи є поліморфними, прояв росту колоній починається на 10-30 добу, вони представлені як гладенькими та блискучими S-формами, так і шорсткими R-формами.

Четверта група: до цієї групи належать швидкорослі мікобактерії, які проявляють свій ріст на поживному середовищі впродовж 3-10 діб. До даної групи відносять *Mycobacterium flavescens*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium peregrinum* та *Mycobacterium smegmatis*. Представники даної групи мікобактерій проявлять ріст на 3-7 добу, колонії поліморфні, зустрічаються і гладенькі S-форми, і шорсткі R-форми (Головко et al., 2016).

Недоліком даної класифікації є те, що вона не демонструє ступінь патогенності атипових мікобактерій. У зв'язку з цим існують класифікації за ступенем патогенності. Згідно яких до високопатогенних відносять ті види мікобактерій, які є небезпечними як для тварин, так і для людини, а саме *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*. До потенційно небезпечних відносять ті види мікобактерій, які здатні викликати захворювання за певних умов: *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium ulcerans*. Крім того виділяють мікобактерії, які зазвичай є безпечними, але виявляються у навколишньому середовищі, наприклад: *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium flavescens*, *Mycobacterium trivial* (Wolinsky, 1992; French et al., 1997).

Існує ще класифікація атипових мікобактерій за частотою клінічного ураження певних органів та систем:

- ураження легень: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi*.
- ураження лімфатичних вузлів: *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium scrofulaceum*.
- ураження м'яких тканин та шкіри: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans*.

- дисеміноване ураження: *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium kansasii* (Шевченко і ін., 2019).

1.3 Морфологія, біологічні та культуральні властивості мікобактерій

На сьогоднішній день особливе значення мають наступні види мікобактерій: *Mycobacterium bovis* - бичачий вид, *Mycobacterium avium* - пташиний вид, *Mycobacterium tuberculosis* - людський вид (Ткаченко, 2017).

Основним збудником для великої рогатої худоби є *Mycobacterium bovis*, проте сприйнятливими до цього виду також є більшість видів ссавців, в тому числі і людини (Романенко, 2013).

Для птахів більш патогенним є збудник *Mycobacterium avium*. Крім птахів до нього є чутливими свині та дикі тварини, у ВРХ викликає короточасну сенсibiliзацію до ППД-туберкуліну. У людини даний вид здатний викликати мікобактеріози. Збудник широко поширений як в солоних, так і в прісних водах та навіть в системі водопостачання, а відповідно й у водопровідній воді (Головко і ін., 2016).

Основним збудником для людини є *Mycobacterium tuberculosis*. Крім людини сприйнятливими є коти, собаки, віслюки, морські свинки. Спостереження Романенко В.П. (2012) вказують, що *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* та *Mycobacterium tuberculosis* являються похідними одного збудника із з адаптованими властивостями життєдіяльності в різних видів хазяїв, як тварин, птахів, так і людини. Відповідно до цього збудник може адаптуватися до неспецифічних для себе хазяїв і призводити у них до захворювання, навіть викликаючи генералізовану форму перебігу туберкульозу (Романенко і ін., 2002, 2003; Романенко, 2013)

Ротов В. І. в своїй роботі висвітлив випадок зараження птахів на благополучній щодо туберкульозу птахофермі від хворої на туберкульоз пташниці. Спостереження ряду авторів. свідчать, що у біля 40% людей хворих

на туберкульоз виявлено збудника *Mycobacterium bovis* (Tsuramura, 1973; Ротов, 1978)

Головною ознакою мікобактерій є те, що всі вони являються кислотостійкими, лугостійкими та спиртостійкими мікроорганізмами. Для мікобактерій характерний поліморфізм, але більшість видів мають вигляд тоненьких паличкоподібних мікроорганізмів із заокругленими краями, рідше вигнуті та кокоподібні форми, які мають довжину 1,0-6,0 мкм і ширину 0,2-0,4 мкм. У мікробній клітині спостерігається так звана «тигроїдність», тобто чергування кислотостійких ділянок (зерна шпленгера) і некислотостійких (зерна Муха) (Калашник, 2016а; 2016б; Ткаченко, 2017).

Мікобактерії є нерухомими, не утворюють спор та капсул, в клітинній стінці містять високу кількість ненасичених жирних кислот, ліпідів та восків, які власне і забезпечують кислотостійкість, лугостійкість та спиртостійкість. Мікобактерії відносять до групи грампозитивних мікроорганізмів, проте анілінові фарби вони сприймають недостатньо, тому їх фарбування проводять за методом Ціля-Нільсена, даний метод застосовують через кислотостійкість мікобактерій. Суть метода полягає в тому, що товста і міцна клітинна стінка мікобактерій здатна утримати в собі барвник (фуксин Пфейфера) після обробки сірчанокислим спиртом, в результаті чого під час мікроскопіювання ми бачимо червоні мікобактерії, а на фоні фіолетові некислотостійкі мікроорганізми, знебарвлені сірчанокислим спиртом і зафарбовані метиленовим синім (Daffé & Draper, 1998; Goren, 2009; Ткаченко, 2017).

Мікобактерії є аеробами, мезофілами (з оптимальною температурою культивування 37-41°C). ростуть на складних елективних середовищах, які в своєму складі містять яєчний жовток, солі та гліцерин. Оптимальними для культивування мікобактерій є наступні середовища: «Stonebrink», Мордовського («Нове»), Левенштейна-Йєнсена, Петраньяні, Фінн-2, Гельберга, Павловського та інші (Финн, 1973; Кассич і ін., 1990; Ткаченко, 1998; Головка і ін., 2016).

Залежно від штаму, ріст на середовищі проявляється через 7-90 діб. *Mycobacterium bovis* та *Mycobacterium tuberculosis* мають вигляд матових, сухих,

крихких, шорстких колоній неправильної форми з нерівними краями (R-форми), рідше зустрічаються гладенькі, блискучі колонії (S-форми) або суцільне нашарування на поверхні середовища. Мають колір слонової кістки, з поступовим старінням культури набувають кремового кольору.

Mycobacterium avium, навпаки, зазвичай гладенькі (S-форми), блискучі, вологі, всередині утворюються підвищення. Колонії кольору слонової кістки, але при старінні культури можуть набувати жовтого або жовто-гарячого забарвлення (Beerwerth, 1976; Beerwerth et al., 1979).

Всім мікобактеріям властива здатність змінювати свої фенотипові та генотипові властивості. Тобто для збудника характерна мінливість, здатність пристосовуватися до зовнішніх умов. Під дією різних несприятливих факторів, лікарських, а особливо протитуберкульозних засобів, для мікобактерій є характерною трансформація. При цьому змінюються ліпідний склад, морфологія, культуральні, біологічні та біохімічні властивості, зниження метаболізму. В більшості, L-форми мають нижчу вірулентність від похідної мікробної клітини. Такі зміни можуть бути як стабільними, так і нестабільними (Вейсфейлер, 1975)

Окрім вищесказаних змін, змінюється також і стійкість мікобактерій до дії хімічних і фізичних факторів навколишнього середовища.

Мінливість мікобактерій може проявлятися у вигляді трансформації їх у L-форми, у сферопласти (у яких частково збережена клітинна оболонка), у протопласти (повністю позбавлені клітинної оболонки, а верхнім шаром слугує цитоплазматична мембрана), фільтривні форми, дисоціативні форми (Beran et al., 2006; Ткаченко, 2017).

При проведенні мікроскопії можна побачити дрібні округлі шаровидні тільця, які здатні проникати крізь бактеріальні фільтри, такі форми мікобактерій називають L-формами. Для L-форм характерною ознакою є значна деформація або повна відсутність клітинної стінки. Важкість виявлення L-форм полягає у тому, що внаслідок часткової втрати клітинної стінки вони не здатні добре

забарвлюватися аніліновими фарбами, побачити їх можна з допомогою фазово-контрастного мікроскопа (Markova et al., 2015).

Деякі L-форми мають здатність до повернення в типову вихідну форму, тобто є нестабільними. Відповідно, L-форми, які не реверсують у вихідну форму називаються стабільним. Вважається, що більш високовірулентними є нестабільні L-форми мікобактерій, так як вони здатні викликати генералізовану форму туберкульозу у лабораторних тварин (Вейсфейлер, 1975; Завгородній і ін., 20146).

Для культивування L-форм використовують поживні середовища, які містять сироватку крові. Часто застосовують напіврідке середовище Школьнікової Е.А. в модифікації Дорожжкової. Первинний ріст на середовищі починає проявлятися вже через 14 діб. Ріст проявляється у вигляді численних дуже дрібних ніжних колоній, розміром від невидимого неозброєним оком до макового зерна, в деяких випадках спостерігається ріст у вигляді помутніння, «димки» по ходу посіву (Чернушенко і ін., 2002; Ткаченко, 2017)

Колонії можуть бути представлені поліморфними елементами, у вигляді елементарних тілець, зернистих елементів, великих тіл розміром до 50 мкм, ниткоподібних структур, безструктурних безформних елементів (Ткаченко, 2017).

1.4 Епізоотологічні особливості туберкульозу

На сьогоднішній день проблема активного поширення туберкульозу є надзвичайно актуальною серед лікарів-епідеміологів, так як кількість населення, яке хворіє на туберкульоз стрімко збільшується.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, біля 55% захворівших на туберкульоз людей в усьому світі проживають в країнах Азії, біля 30% в країнах Африки, близько 7% захворівши з Східно-Середземноморського району, 5% проживають в Європейському і 3% в Американському регіонах. Найчастіше туберкульоз реєструється в Індії, Китаї, Південно-Африканській Республіці, Нігерії та Індонезії. Також дані Всесвітньої організації охорони здоров'я

вказують, що в Європейському регіоні найбільш небезпечними є наступні держави: Республіка Молдова та Румунія.

Не дивлячись на те, що серед тварин не спостерігається настільки широкого і стрімкого поширення епізоотичного процесу, а навпаки за останні 15-20 років значно покращилась ситуація, епізоотологи не залишаються осторонь й продовжують активне проведення епізоотологічного моніторингу та ветеринарно-санітарних заходів для повного викорінення даної проблеми (Завгородній і ін., 2014а).

Стегній Б.Т. і Завгородній О.І. висвітлюють, що в 2000-х роках в Україні офіційно встановлено туберкульоз у великої рогатої худоби більше ніж в 100 неблагополучних пунктах, у 2005 році таких пунктів було вже 29, через рік їх кількість ще зменшилась і становила 27 неблагополучних щодо туберкульозу господарств. У 2007 році їх кількість збільшилась до 60, внаслідок виникнення рецидивів у раніше оздоровлених пунктах (Стегній і ін., 2012).

Проте не дивлячись на те, що офіційно поголів'я сільськогосподарських тварин в Україні вважається оздоровленим від туберкульозу, щороку виявляють тварин, які є сенсibiliзованими до ППД-туберкуліну для ссавців.

Завгородній О.І. та співавтори вказують, що основними причинами виникнення туберкульозу є неретельне дотримання ветеринарно-санітарних заходів, організації діагностичних та профілактичних заходів. Крім того, нерідко на тваринницьких господарствах утримують в загальному ангарі тварин, які позитивно відреагували на туберкулін, до того ж застосовують незнезаражене молоко таких тварин для відгодовування молодняка (Завгородній і ін., 2014а).

Сприйнятливими до туберкульозу є понад 55 видів ссавців і близько 25 видів птахів. Із свійських тварин найбільш чутливими є велика рогата худоба, свині та коні, рідко собаки, із свійської птиці найчутливішими вважаються кури та фазани.

Велика рогата худоба частіше заражається в стійловий період, проте зараження в пасовищний період також не є рідким явищем. Захворювання поширюється в стаді шляхом перезараження тварин.

Коні можуть заразитися виключно при безпосередньому контакті з хворими тваринами або при використанні спільних годівниць чи пасовищ. Свині теж заражаються при прямому контакті з хворими тваринами і птахами, або в разі використання в їжу продукції тваринного походження без необхідного знешкодження.

Собаки хворіють рідко, проте такі випадки реєструються. Зараження може відбуватися як внаслідок згодовування незнешкодженого молока та м'яса від хворих тварин, так і внаслідок контакту з хворими на туберкульоз людьми (Кассич і ін., 1990; Каришева, 2002).

Курачі є досить сприйнятливі до туберкульозу, Ротов В.І. вказує, що рівень їх зараженості становить 2-37% (Ротов, 1978).

Основним джерелом збудника інфекції вважаються хворі тварини, птиця та людина, які можуть виділяти збудник з харкотинням, фекаліями, молоком, спермою та сечею. При виділенні збудника у навколишнє середовище він ще досить довго залишається життєздатним, наприклад, у ґрунті – близько 2-х років, у річковій воді та пасовищах до 1-го року, під розсіяним сонячним світлом зберігає життєздатність близько 30-40 діб.

Основними шляхами зараження сприйнятливого організму вважається аерогенний та аліментарний, рідше внутрішньоутробний, через слизові оболонки, кон'юнктиву та шкіру (Каришева, 2002; Cassidy, 2006; Skuce et al., 2012; Романенко, 2013).

Факторами передачі збудника слугують повітря, ґрунт, вода, корм, предмети догляду тварин. В останні роки вчені-епідеміологи та епізоотологи почали виявляти мікобактерії в зернових культурах та кормових сумішах (Argueta et al., 2000; Khol et al., 2010). Різні наукові видання повідомляють дані, що мікобактерії виділяються з організму різноманітних безхребетних, зокрема з дощових хробаків, двокрилих та тарганів (Fischer et al., 2003a, 2004a; Arif et al., 2017). Результатами досліджень таких вчених, як Sramova et al. (1992) та рядом інших авторів встановлено і доведено, що членистоногі комахи на різних стадіях свого розвитку можуть відігравати роль як механічного хазяїна, так і

біологічного переносника для багатьох видів мікроорганізмів (Despins et al., 1994; Jalil et al., 2012; Kassiri, & Kazemi, 2012; Kappel et al., 2013). Відповідно комахи можуть бути як резервуаром збудника, так і фактором передачі й поширення (Foil & Gorham, 2000; Malik et al., 2013; Erfan et al., 2015; Moges et al., 2016;).

Чисельні роботи зарубіжних науковців у результатах своїх досліджень показали, що мікроорганізми здатні залишатися в організмі комах життєздатними протягом певного часу (Tatfeng et al., 2005; Nagham et al., 2011; Akinjogunla et al., 2012). Також комахи здатні виділяти через екскременти ці мікроорганізми у зовнішнє середовище, контамінуючи його (Fischer et al., 2003b; Fischer et al., 2005; Fischer et al., 2006; Faulde & Spiesberger, 2013).

Потенціальна підтримка комах життєздатних бактерій *in vitro* підтверджується наявністю бактерій в їх організмі, що належить до комплексу *Mycobacterium chelonae*, нещодавно виділеного під час створення первинної клітинної лінії з кліщів, спійманих у полі (Palomar et al., 2019). Кліщі є активними переносниками багатьох хвороботворних мікробів, включаючи облігатні внутрішньоклітинні бактерії (Laukaitis & Macaluso, 2021)

Ferreira et al. (2018) та Tongluan et al. (2021) повідомляють про виявлення атипових мікобактерій у кліщів. Автори вказують, що кліщі відіграють важливу роль у передачі інфекційних захворювань та здатні підтримувати трансоваріальну передачу широкого спектру патогенів, включаючи віруси, бактерії та найпростіших. Дослідники довели трансоваріальну передачу *M. leprae* у дорослих самок кліща *Amblyomma sculptum*, а також інфекцію та ріст *M. leprae* в клітинних лініях кліщів. Продемонстрували, що РНК і антигени *M. leprae* зберігаються в середній кишці та присутні в яєчниках дорослих самок щонайменше дві доби після орального інфікування, а також присутні в їх потомстві (яйцях і личинках), що демонструє наявність трансоваріальної передачі цього збудника.

Durnez et al. (2008) та Fisher et al. (2000) встановили наявність мікобактерій в організмі гризунів та комахоїдних тварин.

Аналізуючи існуючі результати досліджень, можна припускати, що роль комах у процесі розповсюдження мікобактерій на достатньо велику відстань та передачу його сприйнятливим макроорганізмом не є другорядною.

Зокрема необхідно враховувати, що на тваринницьких господарствах зберігаються певні запаси зерна, зернових кормів та інших злакових кормових сумішей. При неправильних умовах зберігання у них заводяться жуки-шкідники зернових запасів. Основними представниками в нашій країні є жуки-довгоносики (лат. *Sitophilus oryzae*), які можуть бути інфікованими мікобактеріями туберкульозу від латентно або клінічно хворих тварин, що виділяють мікобактерії у зовнішнє середовище і контамінують його. В результаті чого інфіковані жуки можуть виступати в ролі як механічних, так і біологічних переносників. небезпека полягає в тому, що комахі можуть розповсюджувати мікобактерії на достатньо великі відстані, контамінуючи поверхні, на яких вони переміщуються. Крім того, забруднені мікобактеріями жуки можуть бути захоплені сприйнятливими тваринами або птахами. Потрапляючи в шлунково-кишковий тракт, під дією шлункового соку жуки перетравлюються, але кислотостійкі мікобактерії залишаються життєздатними і можуть затримуватися в організмі сприйнятливого макроорганізму або знову виділятися з екскрементами у навколишнє середовище.

Враховуючи вищесказане, стає зрозумілим, що питання встановлення ролі жуків-шкідників зернових запасів у процесі розповсюдження й передачі мікобактерій туберкульозу є надзвичайно важливим і актуальним.

Не дивлячись на те, що цим питанням займаються не один рік, на сьогоднішній день воно залишається остаточно нез'ясованим. Розроблена методика дослідження жуків потребує подальшого розширення та удосконалення. З'ясування цих питань буде сприяти більш детальному вивченню ролі комах у поширенні інфекції, що, в свою чергу, допоможе вирішити питання попередження виникнення туберкульозу і в цілому ліквідації інфекції.

1.5. Морфологія та біологічні особливості та методи дослідження жуків

Жуки-шкідники зернових запасів є надзвичайно поширенні на території нашої держави, тому проблема їх появи в зернових запасах є актуальною. Для проведення наукових досліджень обрані жуки довгоносики, з родини *Curculionidae*, ряд твердокрилі, а саме рисовий довгоносик (лат. *Sitophilus oryzae*). Даний вид обраний не випадково, він є одним з найбільш масових шкідників з групи твердокрилих та дуже поширеними на території України, а тому випадки появи їх в амбарах, зокрема в тих, які знаходяться на тваринницьких підприємствах, зустрічаються часто.

Роботи таких авторів як Бондаренко (2015а; 2015б), Горщар і ін., (2016), Черних і ін., (2016) відображають, що довгоносики є одними із найбільш домінуючих серед інших жуків-шкідників зернових запасів.

Закордонні автори Harein & De Las Casas (1968) та Harein et al. (1970) провели дослідження комірнього довгоносика на різних стадіях розвитку жука і виділили з організму шкідника такі умовно-патогенні мікроорганізми: *Escherichia intermedia*, *Proteus rettgeri*, *P. vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Klebsiella-Aerobacter*. Результат даної роботи дає підстави припускати, що довгоносики можуть бути носіями також і патогенної мікрофлори, зокрема представників роду *Mycobacterium*. І забруднюючи зерно бути потенціальним резервуаром збудника туберкульозу.

Рисовий довгоносик досягає 2,3-3,5мм в довжину, за кольором він від темно-коричневого до чорного, на тілі є дві нечіткі червоні плями. Ротовий отвір гризучого типу, розвинута верхня щелепа, на голові багаточленникові вусики. Яйця жука овальної форми, за розміром 0,6-0,7 мм, сіруватого кольору. Личинки і лялечка жовтуваті-білі, личинки довжиною 2,5-3мм, лялечка до 5мм.

Особливості циклу розвитку: жуки живуть біля 100-200 діб, плодючість самок сягає до 500 яєць протягом життя. Самка розміщує яйця у ямку на зернині, яку завчасно прогризає і заливає секретом, який затвердіває. Личинки розвиваються всередині зернини, в яку вони вгризається після виходу з яйця. Оптимальними умовами життєдіяльності є вологість біля 10-15%, температура

10-36°C. Розвиток однієї генерації триває 38-140 діб. В середньому цикл розвитку від яйця до дорослого жука проходить в одній зернині протягом 50-70 діб. Розвиток яйця триває 10-15 діб, личинки – 30-40 діб, лялечки – 12-15 діб. За рік реєструють 1-4 поколінь, залежно від температурного режиму. Довгоносики уражають пшеницю, злакові культури, рисову, вівсяну, гречану крупи, макаронні вироби, сильно спресоване борошно (Гусєв і ін., 1962).

Експериментальне зараження жуків на будь-якій стадії їх розвитку проводять шляхом інфікування зерна, рису або іншого матеріалу, яким харчується певний вид, із подальшим поміщенням в контамінований субстрат і витримують жуків певний час в ньому. Для виявлення мікроорганізмів в тілі жука запропоновано гомогенізувати жуків в стерильній ступці, попередньо промивши двічі в ізотонічному розчині натрію хлориду 0,9% та в 96% етанолі. Або використовувати для дослідження безпосередньо кишечник жука, проте даний метод є доречним лише для жуків великих за розміром та не є ефективним з жуками, розміри яких не перевищують 1,5-3 мм.

Для дослідження зерна, концентрованих кормів чи іншої кормової суміші на наявність в них мікроорганізмів, зокрема мікобактерій, Argueta et al. (2000) запропонували метод виділення їх з кормів. В процесі проведення дослідів об'єкти дослідження, якими були концентровані корми, сіно та трава, подрібнювались та заливались фізіологічним розчином з наступною витримкою тривалістю 20-30 хвилин. Отриману масу фільтрували через марлевий фільтр з наступною обробкою отриманої суспензії 4% розчином їдкого натру (за методом Алікаєвої А.П.) та розчинами їдкого натру, сірчаної кислоти та Септусину з метою пригнічення сторонньої некислотостікої мікрофлори. Після чого суспензія була посіяна на живильне середовище. В результаті даного дослідження з кормових сумішей вдалося виділити *Mycobacterium gordonae*.

1.6. Діагностика туберкульозу

Своєчасне встановлення діагнозу на туберкульоз і виявлення хворих тварин являється важливим заходом для оздоровлення неблагополучних

тваринницьких ферм. Діагноз можна встановити керуючись лише комплексним підходом вирішення цього питання. Діагностика базується на алергічних, бактеріологічних та патолого-анатомічних методах дослідження. Враховуючи, що туберкульоз є хронічно перебігаючим захворюванням з повільним розвитком інфекційного процесу, клінічні ознаки можуть з'явитися через рік після зараження, тому за допомогою клінічного огляду встановити діагноз вчасно майже неможливо.

Основним загальноприйнятим прижиттєвим методом являється алергічний метод дослідження (туберкулінізація), тобто введення внутрішньошкірно (рідше підшкірно) алергену для великої рогатої худоби або очна проба для коней. ППД-туберкулін являє собою фільтрати культур мікобактерій. В Україні для проведення туберкулінізації використовують сухий очищений туберкулін для ссавців та птиці. На сьогоднішній день нерідко проводиться симультанна проба, суть якої полягає в одночасному застосуванні ППД-туберкуліну та алергену атипових мікобактерій (ААМ), так як існує велика кількість сапрофітних мікобактерій, які здатні призводити до параспецифічної реакції на введення туберкуліну. Відповідно специфічність туберкулінізації різко знижується. Основна мета симультанної проби полягає у визначенні природи алергічної реакції та диференціації сенсibiliзації організму. Суть проведення туберкулінізації базується на явищі підвищеної чутливості організму повільного типу на повторне введення алергену (Кассич і ін., 1990; Кассич і ін., 2004; Фещенко & Мельник 2004).

Облік результатів проводять через 72 години у великої рогатої худоби, через 48 годин у дрібної рогатої худоби, собак та хутрових звірів і через 30-36 годин у птахів. Позитивною вважається реакція, коли в місці введення утворюється тістувате або м'яке розлите набрякання без чітких меж. Крім цього, реєструється болючість, гіперемія та гіпертермія в місці інокуляції.

Після огляду місця інокуляції туберкуліну, вимірюють товщину складки з допомогою кутиметра і порівнюють її з товщиною складки до введення або поруч з ним. Алергічна проба вважається позитивною, коли товщина складки

збільшується на 3мм і більше у великої рогатої худоби, на 2 мм і більше у бугаїв плідників. У дрібної рогатої худоби, свиней, собак і хутрових звірів у разі утворення набряку в місці введення.

Очна проба застосовується у коней або у великої рогатої худоби як додаткову до внутрішньошкірної. Позитивною вважають очну пробу, в результаті якої у тварини спостерігається витікання від слизового до гнійного тяжа, набряк та почервоніння кон'юнктиви.

Проте на сьогоднішній день питання ступеня достовірності даного методу досі залишається відкритим. Загальновідомо, що реакція на туберкулін не завжди є позитивною, навіть при відкритій формі захворювання. Відповідно, негативний результат не може однозначно виключати туберкульоз, також є необхідність диференціювання реакцій тварин на туберкулін та вказують на те, що за неправильного утримання тварин, яке призводить до стресу, викликає недостовірну неспецифічну реакцію на введення туберкуліну.

Окрім туберкулізації поширеним є бактеріологічний метод дослідження, який включає в себе проведення мікроскопії, посів на живильне середовище (культуральне дослідження) та постановки біопроби на чутливих лабораторних тваринах.

Проведення мікроскопії – це швидкий метод виявлення мікобактерій, проте він не є високочутливим, так як виявити збудника можна лише за умови достатньої його кількості в матеріалі. Крім того, з допомогою мікроскопії дуже важко відрізнити мікобактерії туберкульозу від атипових мікобактерій. На сьогоднішній день найбільш поширеним способом є проведення світлової мікроскопії, проте також можливе застосування люмінесцентної мікроскопії, яка вважається більш чутливою (Березовський, 2005).

Для проведення мікроскопії відбираються лімфатичні вузли, шматочки паренхіматозних органів (легені, печінку, селезінку) та робляться мазки-відбитки. Мазки висушуються на повітрі та фіксуються. Для проведення світлової мікроскопії виготовлені мазки зафарбовуються за методом Ціля-

Нільсена. Надалі продивляються їх під імерсійною системою мікроскопа (Roberts et al., 1994).

Більш чутливим, ніж бактеріоскопічний, є культуральний метод дослідження. Він являється основним методом для виділення збудника, полягає у здатності мікобактерій розвиватися на поживних середовищах *in vitro*. Окрім того, що даний метод є більш чутливим, він дає змогу виділити чисту культуру мікобактерій, навіть за мінімальної їх кількості у досліджуваному матеріалі (Narvaiz de Kantor et al., 1998; Ткаченко і ін., 2010). Суть метода полягає у посіві суспензії з дослідного біологічного матеріалу на поживне середовище з подальшою ідентифікацією колоній. Готові посіви передивляються щотижня з обов'язковою реєстрацією колоній, що виростають. Для отримання росту чистої культури біологічний матеріал попередньо обробляють для пригнічення сторонньої мікрофлори. Для цього існують метод Мазуренка В.А. зі співавторами (ферментації), метод Гона, метод Алікаєвої А.П.. Найбільшого поширення набув останній, він полягає в подрібненні передпосівного біологічного матеріалу із наступною обробкою 3-6% розчином сірчаної кислоти, промиванням у фізіологічному розчині, після чого шматочки ретельно розтираються із додаванням фізіологічного розчину. Таку суспензію використовують для посіву на живильне середовище, виготовлення мазків та біопроби (Манченко і ін., 1994; Ткаченко і ін., 2010).

Головним недоліком даного методу є повільне розмноження мікобактерій, залежно від штаму, ріст колоній можна очікувати на 7-90 добу (Ткаченко і ін., 2010).

Найбільш точним є біологічний метод дослідження (біопроба). Даний метод дає змогу виявити мікобактерії навіть за наявності 1-5 мікробних клітин в дослідному матеріалі. Суть проведення біопроби полягає у відтворенні захворювання на чутливій біологічній моделі. Даний метод допомагає визначити вид мікобактерій. При дослідженні матеріалу від ссавців найчутливішою моделлю вважаються мурчаки, а при дослідженні матеріалу від птахів-кури (Kashino et al., 2008; Clark et al., 2014).

Завис культури або суспензію з досліджуваного матеріалу вводять морським свинкам підшкірно в ділянку внутрішньої сторони стегна, а птахам – у підкрильцеву вену. Рідше лабораторних тварин заражають внутрішньочеревно, аліментарно або аерогенно, в аеродинамічній камері, застосовуючи аерозолі. За дослідними тваринами спостерігають протягом 90 діб. Збудник туберкульозу викликає у мурчаків генералізовану форму туберкульозу через 20-90 діб після зараження. Впродовж цього часу, кожні 30 діб проводять туберкулінізацію, в разі позитивної проби, одну тварину евтаназують і проводять патолого-анатомічне дослідження, при виявленні характерних для туберкульозу змін в легенях, печінці, селезінці та лімфовузлах, їх відбирають і роблять з них мазки-відбитки для виявлення мікобактерій та посів на живильне середовище. У тому випадку, коли дослідна тварина не загинула впродовж досліду (90 діб), її евтаназують і також проводять патолого-анатомічне та бактеріологічне дослідження (Ткаченко і ін., 2010).

Під час патологоанатомічного дослідження у хворих на туберкульоз тварин виявляють утворення в органах і тканинах специфічних гранульом (туберкулів) із сирнистим вмістом. Туберкули за розміром сягають від просяного зерна, до курячого яйця, за консистенцією вони є щільними, оточені сполучною тканиною, містять ділянки звапнування та осередки казеозного некрозу. Залежно від тривалості інфекційного процесу, на початкових стадіях розвитку захворювання туберкули мають вигляд дрібних напівпрозорих вузликів, а на більш пізніх стадіях вони набувають сіро-жовтого кольору, стають непрозорими, а вміст стає сухим і сирнистим. Локалізуватися такі вузлики можуть на будь-яких органах і тканинних структурах тварин, окрім ороговілих тканин. Переважним місцем локалізації вузликів є паренхіматозні органи, а саме легені, селезінка та печінка, а також серозні покрити і лімфатичні вузли, особливо заглиткові, підщелепові, бронхіальні, середостінні та брижові. За генералізації інфекційного процесу туберкули виявляють в кишечнику, кістковій тканині, підшкірній клітковині, на шкірі, в матці та яєчниках.

Також характерним є виснаження загиблої або евтаназованої тварини, анемія, різке збільшення розміру печінки, селезінки та лімфатичних вузлів, серозно-фібринозний інфільтрат у підшкірній клітковині (Каришева, 2002).

Крім того, для діагностики туберкульозу розроблені молекулярно-генетичні методи дослідження, основним з яких являється полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), суть якого полягає у багаторазовому збільшенні числа ділянок ДНК. Полімеразна ланцюгова реакція дає змогу виявити ДНК або фрагменти ДНК мікобактерій навіть за дуже малої кількості збудника в дослідному матеріалі, що свідчить про високу чутливість ПЛР-дослідження. (Rozales et al., 2014).

Метод ПЛР здатен діагностувати як гострі, так і латентні форми туберкульозу і є ефективним за необхідності встановлення діагнозу за короткий час (Стегній і ін., 2006).

Також до переваг даного методу відносять його здатність не тільки виявляти генетичний матеріал мікобактерій, диференціювати патогенні види від атипових, але і визначати резистентність збудника до лікарських засобів.

Ще одним сучасним методом дослідження вважається імуноферментний аналіз (ІФА), який дозволяє виявляти в біологічному матеріалі і антитіла, і антигени. Першим даний метод дослідження з метою виявлення антитіл до мікобактерій туберкульозу застосував Е. Nessau в 1976 році. Проте на сьогоднішній день ІФА вважається лише додатковим методом діагностики і не є високоспецифічним, у зв'язку з тим, що за результатами дослідження важко диференціювати патогенні мікобактерії від непатогенних.

1.7. Висновок з огляду літератури

Аналіз вітчизняних та закордонних джерел доводять, що проблема туберкульозу є актуальною в більшості держав світу. Дане захворювання завдає серйозних економічних та соціальних втрат, а враховуючи, що воно є антропозоонозом, то становить як епідеміологічну, так і епізоотологічну небезпеку.

Внаслідок особливостей будови, мікобактерії володіють високою стійкістю до кислот, лугів та спиртів. Основними патогенними видами вважаються *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium avium*. Джерелом збудника хвороби є хворі ссавці та птиця, які виділяють мікобактерії у навколишнє середовище з секретами та екскретами. Сприйнятливі тварини заражаються аерогенно, аліментарно, рідше внутрішньоутробно, перкутанно та через слизові оболонки. Факторами передачі слугують контаміновані корми, вода, повітря та предмети догляду тварин.

За останні 10 років, спираючись на результати досліджень окремих науковців постало питання ролі комах у поширенні та передачі мікроорганізмів. Дослідження показують, що комахи можуть відігравати роль біологічного та механічного переносника для багатьох видів мікроорганізмів.

Проаналізувавши існуючі дані можна припустити, що жуки-шкідники зернових культур можуть відігравати роль резервуара мікобактерій туберкульозу та приймати участь у поширенні збудника на великі території. Проте офіційно випадків зараження тварин від комах не зареєстровано, що і стало основою для проведення досліджень в цьому напрямку. Тому на сьогоднішній день є актуальним питання визначення епізоотологічного значення жуків у процесі виникнення та поширення туберкульозу й встановлення зміни морфології та біологічних властивостей мікобактерій після пасажів через організм жуків.

У розділі 1 використано матеріали з відповідним посиланням на такі наукові джерела зі списку літератури: [4-6; 8-11; 15; 17; 19; 21-22; 24-27; 30-31; 33-34; 36; 38; 41-44; 47-48; 50-51; 53; 55-57; 59; 61; 64; 66; 70-71; 75-76; 79; 81; 85-87; 91-94; 100; 103-104; 107; 113-114; 116-118; 121-122; 124-128; 131-134; 137; 139; 141-142; 144-145; 147-148; 151; 153-165; 167; 170].

Розділ 2. Матеріали та методи

2.1. Місце проведення досліджень

Дисертаційну роботу виконано протягом 2019-2023 років в умовах навчальної лабораторії кафедри інфекційних хвороб тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету. Окремі дослідження проведені в умовах Білоцерківського національного аграрного університету.

Експериментальні дослідження відповідають нормам «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001) і не суперечать положенням «Про захист тварин від жорстокого поводження» та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Франція, м. Страсбург, 1988).

Усі дослідження були проведені згідно з третім рівнем біологічної безпеки.

Дисертаційні дослідження проводились послідовно, схема представлена на рис. 2.1.

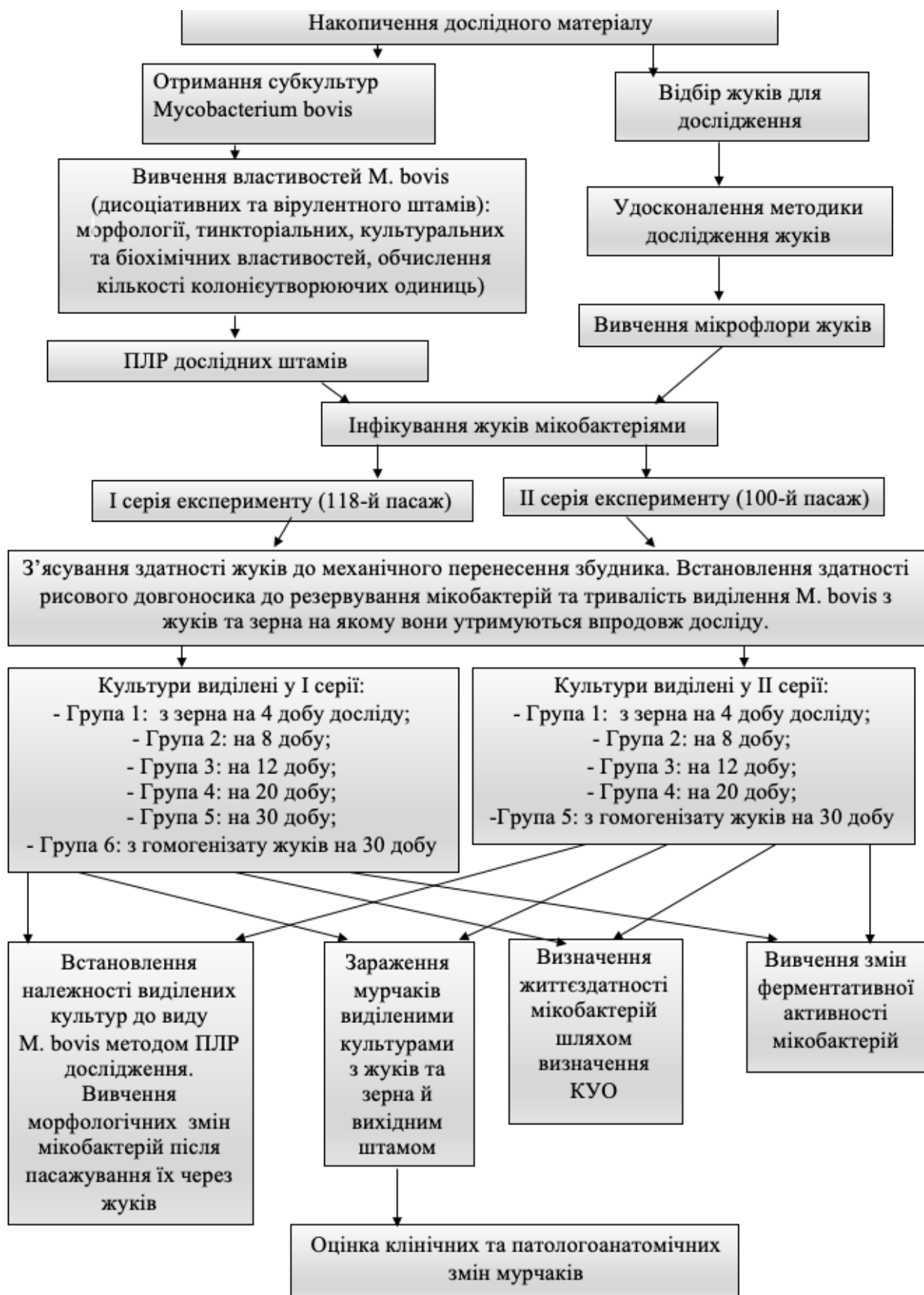


Рис. 2.1. Схема дослідження

2.2. Матеріали дослідження

Для проведення експериментальної частини використовували музейний патогенний штам *M. bovis* (пасаж №100), отриманий від реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців тварини (ВРХ) та дисоціативні штами (пасаж №117-а та №118), що був отриманий шляхом послідовних пересівів культури на щільне штучне яєчне середовище Мордовського («Нове»), зберігався в умовах низької плюсової температури ($3,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), внаслідок чого відбулось відщеплення авірулентних мікобактерій від материнського штаму.

Для дослідження були використані жуки-шкідники зернових запасів виду рисовий довгоносик (лат. *Sitophilus oryzae*), які були отримані з ураженого зерна.

2.3. Методи досліджень

2.3.1. Бактеріологічне дослідження

Для досягнення мети дисертаційної роботи, дослідження проводились у п'ять етапів.

На першому етапі дослідження отримували та накопичували субкультуру дослідних штамів мікобактерій, проводили вивчення морфології, культуральних, тинкторіальних та біохімічних властивостей, визначення життєздатності бактеріальної клітини та ПЛР дослідження дослідних культур, встановлювали здатність до росту на простих живильних середовищах (МПА та МПБ).

Накопичення культури проводили шляхом прямих посівів дослідних штамів на живильне середовище Stonebrink (GrasoBiotech, Польща) для 100-го пасажу, яке купували готовим та на щільне яєчне середовище Мордовського («Нове») з рН 6,5-6,7 (для пасажів №117-а та №118), яке готували самостійно, до складу якого додавали яєчний жовток, глікокол, сольовий розчин (К-фосфорнокислий однозаміщений, сірчаноокисла магnezія, натрій лимоннокислий), глікокол із додаванням гліцерину та дистильованої води, 1%-ий розчин малахітової зелені.

Посів проводили з використанням бактеріологічної петлі. Пробірки з посівами інкубували в термостаті за температури $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ та в холодильнику за $3,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ з постійним контролем росту протягом 90 діб.

Культуральні властивості оцінювали за наступними показниками: час появи первинного росту, характер та інтенсивність росту колоній, їх кількість, розмір, характер поверхні, форму, колір, консистенція (Ткаченко і ін., 2010).

Для вивчення морфології та тинкторіальних властивостей бактеріальної клітини виготовляли мазки дослідних культур, які забарвлювали за методом Ціля-Нільсена, оцінювали: форму, довжину, товщину, кінці, розташування мікробних клітин, наявність або відсутність зернистості, кислотостійкість збудника та наявність L-форм.

Дослідження мазків проводили під імерсійною системою мікроскопа OLYMPUS XS зі збільшенням $\times 1600$, із використанням цифрової камери Cyberlink You Cam.

2.3.2. Біохімічне дослідження

При визначенні біохімічних властивостей дослідних культур досліджували каталазну, пероксидазну, дегідрогеназну активність, здатність до редукції нітратів та до гідролізу ТВІН-80.

Каталазну та пероксидазну активність визначали одночасно за модифікованою методикою Е. Богена (1955). Для дослідження використовували наступні реактиви: 0,5%-ий розчин пірогалолу А; 2,0%-ий розчин перекису водню (пергідроль), який готували та змішували перед постановкою реакції. У пробірки з дослідними культурами вносили отриманий розчин в кількості 4,0-8,0 мл в кожному (для повного покриття розчином культури). Принцип реакції полягає в розщепленні під дією каталази перекису водню на воду та атомарний кисень із виділенням бульбашок кисню та переходу пірогалолу в пурпурогалин під впливом пероксидази в присутності перекису водню.

Облік каталазної активності проводили через 15 та 30 хв після постановки реакції. Реакцію оцінювали візуально за бурхливістю та кількістю виділених

пухирців кисню (оцінка в плюсах): (+++) – рясне виділення бульбашок; (++) – помірне; (+) – поодинокі бульбашки; (-) – виділення пухирців відсутнє.

Визначення пероксидазної активності культур проводили через 1,5-2 год шляхом оцінювання вищенаведеної реакції. Облік також проводили візуально, визначаючи утворення коричневого пігменту в дослідних культурах (оцінка в плюсах): (+++) – темно-коричнєве забарвлення колоній; (++) – коричневе; (+) – блідо-коричнєве забарвлення; (-) – колір не змінюється.

Дегідрогеназна активність полягає у виявленні окисно-відновного ферменту дегідрогенази і продуктів метаболізму (Bloch, 1950). Для дослідження використовували аглютинувальні пробірки; завис із мікробних клітин; фосфатний буфер рН 7,4-7,6; 1,0%-ий розчин глюкози і 0,02%-ий розчин метиленового синього. Бактеріологічною петлею відбирали бактеріальну масу дослідних культур та відважували на торсіонних вагах. Для проведення реакції 4,0 см³ завису мікробних клітин з концентрацією 10 мг/см³ у фосфатному буфері рН 7,4-7,6 перемішували з 1,0 см³ 1%-го розчину глюкози і 0,1 см³ 0,02%-го розчину метиленового синього. На отриманий вміст у пробірці нашаровували стерильну вазелінову олію. Пробірки інкубували в термостаті за температури 38,0±0,5°C з подальшим обліком часу знебарвлення метиленового синього. Оцінювали реакцію візуально через 15-30 хв та 24 год. В якості контролю були пробірки із зависом мікобактерій та метиленовим синім без глюкози.

Нітратредуктазна активність полягає в визначенні відновлення нітриту з нітрату. Активність у дослідних штамів мікобактерій визначали шляхом візуального спостереження за кольоровою реакцією з використанням наступних реактивів: 2,0%-ий розчин парадиметиламінобензальдегіду (Р-диметиламінобензальдегід); 0,067 М-фосфатний буфер рН 7,1; 0,1%-ий розчин нітрату натрію; 1,0%-ий розчин соляної кислоти. Активність редукції нітратів визначали наступним чином: на торсіонних вагах відважували 10,0 мг вологої біологічної маси дослідної культури й вносили в бактеріологічну пробірку типу Eppendorf, яка вміщувала 1,0 см³ 0,067 М-фосфатного буфера рН 7,1 з 0,1%-им розчином нітрату натрію.

Після суспензування пробірки витримували в термостаті протягом 20-22 год за температури $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Після чого визначали утворення нітрату шляхом додавання в пробірку двох крапель 2,0%-го розчину Р-диметиламінобензальдегіда на 1,0%-му розчині соляної кислоти. При виникненні жовтого забарвлення реакція вважається позитивною, якщо колір розчину не змінюється – реакція негативна.

За модифікованою методикою Вайна (1962) визначали реакцію гідролізу ТВІН-80. Суть її полягає в тому, що ТВІН-80 зв'язує нейтральний червоний і до реакції дослідний розчин має солом'яно-жовтий колір, але за ензимного гідролізу ТВІН-80 за рахунок звільнення нейтрального червоного відбувається відновлення кольору від рожевого до червоного (за позитивної реакції). Для проведення реакції використовували наступні реактиви: 1/15 М фосфатний буфер рН 7,0 – 100,0 см³, ТВІН-80 – 0,5 см³, основний червоний 0,1%-ий – 2,0 см³. Всі реагенти змішували та розливали по 4,0 см³ у пробірки та автоклавували протягом 15-ти хв за температури $120,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Після розміщували пробірки в термостаті на 24 год для перевірки на стерильність. Емульгували три бактеріологічні петлі кожної дослідної культури в пробірках із субстратом та інкубували в термостаті протягом 10-ти діб. Облік реакції проводили через 4 год, на 5-ту та 10-ту добу. Позитивними вважали результат у разі появи рожевого або червоного забарвлення протягом 10-ти діб, за негативного результату забарвлення не з'являлось.

2.3.3. Визначення життєздатності мікобактерій

Визначення життєздатності мікробних клітин дослідних штамів мікобактерій проводили методом оцінки колонієутворюючих одиниць (КУО) шляхом проведення серійних розведень. Для проведення дослідження використовували мікропробірки типу Eppendorf, у які вносили стерильний ізотонічний 0,9% розчин натрію хлориду в кількості 0,5 см³ в першу мікропробірку та по 0,4 см³ в усі наступні (2-10 мікропробірки). Бактеріальну масу дослідних культур відбирали з пробірок бактеріологічною петлею,

віджимали її між аркушами фільтрувального паперу та відважували 50 мг (0,05 г) на торсійних вагах. Відважену бактеріальну масу вносили в мікропробірку №1 та суспензували, ретельно перемішуючи бактеріальною петлею. Використовуючи інсуліновий шприц відбирали 0,1 см³ отриманої суспензії та переносили в пробірку №2, ретельно перемішавши, відбирали 0,1 см³ та вносили в наступну мікропробірку до десятої включно. Після цього з кожної мікропробірки окремими інсуліновими шприцями відбирали по 0,1 см³ суспензії, яку вносили в 2 пробірки з живильним середовищем Мордовського/Stonebrink та рівномірно розподіляли по поверхні (залишаючи пробірку в нахиленому положенні на 24 год, після чого розміщали вертикально). Пробірки інкубували в термостаті за температури 37,0±0,5°C й за 3,0±0,5°C в умовах холодильника.

При визначенні життєздатності мікробних клітин підрахунок робили в пробірках з найбільшим розведенням, у яких зафіксований ріст. Надалі кількість КУО в 1 г культури обчислювали математично.

2.3.4. ПЛР-дослідження

Всі культури (вихідна та виділені після кожного кроку пасажування через жуків) підлягали ПЛР-дослідженню.

З поверхні середовища відбирали бактеріологічною петлею чисту культуру та суспендували в 1 мл фізіологічного розчину. з суспензії ДНК виділяли за допомогою спін-колонок з використанням комерційного набору IndiSpin Pathogen Kit (INDICAL, Німеччина) згідно інструкції.

Молекулярно-генетичну ідентифікацію проводили за допомогою класичної ПЛР з детекцією в агаровому гелі. Реакцію ампліфікації проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл, яка включала: 12,5 мкл готового ПЛР міксу OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (New England Biolabs, США), 7,5 мкл деіонізованої води, по 1 мкл F та R праймерів і 3 мкл ДНК матриці отриманої на попередньому етапі. Ампліфікацію проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, США) за наступною програмою. Первинна

денатурація 94°C – 1 хв, ампліфікація – 30 циклів: денатурація 94°C – 30 с, відпал (температура залежно від використаного праймери – 30 с, елонгація 68°C – 60 с, фінальна елонгація 68°C – 5 хв).

Для всіх досліджуваних зразків були використані дві пари праймерів направлених на підтвердження належності культур до *M. tuberculosis complex* та наступного уточнення належності до *M.bovis*. Методом VNTR було досліджено культуру до пасажування та ізолят з гомогенізованих жуків на 30 добу досліду. Культури генотипували за допомогою 8 пар праймерів направлених на варіабельні ділянки генів *M. bovis* (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Олігонуклеотидні праймери для ПЛР-ідентифікації штаму *M.bovis* та виконання його VNTR-генотипування.

Назва праймера, локуса (VNTR)	PCR primer (5'–3')	Розмір фрагменту + розмір повтору	Температура відпалу	Джерело
М. tuberculosis complex	CTGGCGGGTCGCTTCCACGA	375	63	(Vázquez-Marruf o et al., 2008)
	TTCGACCGGCGGGACGTCGC			
М.bovis	TCGTCCGCTGATGCAAGTGC	500	55	
	CGTCCGCTGACCTCAAGAAC			
ETR-A / 2165	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTA	195 + 75	52	(Kam et al., 2006)
	T			
	CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGAT			
ETR-B / 2461	TT	121 + 57	58	
	GCGAACACCAGGACAGCATCAT			
	G			
	GGCATGCCGGTGATCGAGTGG			

ETR-C / 577	GTGAGTCGCTGCAGAACCTGCA G	44 + 58	60	
	GGCGTCTTGACCTCCACGAGTG			
ETR-D / 580	GTCAAACAGGTCACAACGAGAG GAA	114 + 77	55	
	CCTCCACAATCAACACACTGGT CAT			
ETR-E / 3192	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTT A	492 + 53	52	
	GTGCCGACGTGGTCTTCAT			
QUB-11a / 2163a	CCCATCCCGCTTAGCACATTCGT A	167 + 69	58	
	TTCAGGGGGGATCCGGGA			
QUB-11b / 2163b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAAT AGG	67 + 69	49	
	CGAAGTGAATGGTGGCAT			
QUB-3232 / 3232	CAGACCCGGCGTCATCAAC	423 + 56	56	
	CCAAGGGCGGCATTGTGTT			

Облік результатів проводили шляхом електрофорезу амплікону в 2% агаровому гелі з додаванням 0,5% етидіум броміду у 1x TBE буфері. Електрофорез проводили протягом 80 хвилин і після завершення процедури реакцію зчитували та здійснювали фотофіксацію результатів електрофорезу у транслюмінаторі за підсвітки ультрафіолетовим світлом. Інтерпретацію результатів дослідження здійснювали аналізуючи довжину специфічного фрагмента у агаровому гелі порівняно із маркером молекулярної маси 100 bp DNA Ladder # N3231S (New England Biolabs, США). Порівняння генотипів за VNTR-аналізом проводили порівнюючи розмір фрагментів для кожної пари праймерів.

2.3.5 Інфікування жуків

На другому етапі дослідження проводили відбір і накопичення жуків, вивчення їх мікрофлори та її ідентифікацію.

Для експерименту були обрані жуки-шкідники зернових запасів виду рисовий довгоносик (лат. *Sitophilus oryzae*). Комахи були відібрані з кормових сумішей (зерна) для гризунів та ідентифіковані за морфологічними ознаками. Накопичення довгоносиків у необхідній кількості проводили шляхом шестимісячного утримання жуків у зерні.

З метою виключення у жуків носійства *M. bovis*, встановлення наявності симбіотної мікрофлори в організмі жуків та її ідентифікації проводили посів гомогенізату довгоносиків на наступні живильні середовища: Stonebrink, Мордовського («Нове»), м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), та середовище Сабуро. Готували мазки з гомогенізату та вирослих колоній на живильних середовищах, забарвлювали їх за Грамом та за методом Ціля-Нільсена для визначення наявності кислотостійких мікроорганізмів. Також проводили біохімічне дослідження вирослих колоній з гомогенізату (визначали каталазну, пероксидазну, дегідрогеназну, нітратредуктазну активність та здатність до гідролізу ТВІН-80).

На третьому етапі проводили розробку й удосконалення та обґрунтування методики експериментального інфікування довгоносиків мікобактеріями, встановлення здатності жуків до резервування в своєму організмі та перенесення життєздатного збудника.

Зараження жуків (мікобактеріями) досягали шляхом утримання їх на контамінованому збудником зерні. Для дослідження використовували попередньо проавтоклавоване зерно пшениці протягом 20-ти хвилин за 1,5 атм.

Визначення необхідної концентрації для контамінації зерна:

З метою встановлення оптимальної кількості культури, що необхідна для інфікування всіх жуків (які будуть знаходитись в контамінованому субстраті) готували завис із дослідного штаму мікобактерій в трьох варіаціях наступним чином (отриманим зависом обробляли зерно):

1. 1 мг бактеріальної маси *M. bovis* в 1 см³ ізотонічного 0,9% розчину натрію хлориду на кожні 10 гр зерна;
2. 5 мг бактеріальної маси *M. bovis* в 1 см³ ізотонічного 0,9% розчину натрію хлориду на кожні 10 гр зерна;
3. 10 мг бактеріальної маси *M. bovis* в 1 см³ ізотонічного 0,9% розчину натрію хлориду на кожні 10 гр зерна.

У контаміноване мікобактеріями зерно розміщували імаго рисових довгоносиків (по 20 шт на кожний варіант) на 3 доби, після чого жуків відмивали в 0,9% ізотонічному розчині натрію хлориду 3-5 разів (залежно від результатів мікроскопії для виключення механічного перенесення збудника), розтирали на предметному скельці. Гомогенізатор і мазки зі змивів забарвлювали за методом Ціля-Нільсена та переглядали під імерсійною системою мікроскопа для визначення відсотка інфікованих жуків залежно від кількості завису використаного для контамінації зерна.

Експериментальне інфікування жуків:

До початку експерименту, з метою виключення в жуків спонтанного носійства *M. bovis*, 20% зібраних зразків піддавали мікроскопічному дослідженню на наявність у них кислотостійких паличок (забарвлення мазків за Цілем-Нільсеном).

Першим кроком дослідження було встановлення здатності рисового довгоносика до механічного перенесення мікобактерій. Для цього було створено дослідну групу до якої увійшло 8 екземплярів жуків, які до інфікування витримувались протягом 7-ми діб у стерильній ємності зі стерильним зерном. Зараження проводили шляхом контамінації зерна зависом дисоціативного штаму *M. bovis* (117-а пасаж) в кількості 10 мг бактеріальної маси в 1 см³ фізіологічного розчину на кожні 10 г зерна, всього було використано 20 г зерна.

Комахи утримувались протягом восьми діб на контамінованому зерні. Впродовж цього часу на 4-ту та 8-му добу відбирали у випадковому порядку по 4 жука й проводили мікроскопічне та культуральне дослідження для встановлення здатності до механічного перенесення та резервування збудника в

своєму організмі. Для цього жуків відбирали стерильним пінцетом та переміщували в пробірку з живильним середовищем Мордовського з рН 6,5 (кожний жук в окрему пробірку). Перебуваючи в пробірці, жуки вільно пересувались, після чого стерильним інструментом видалялись з неї. Пробірки інкубували за температури $3,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, огляд росту проводили щоденно, оцінюючи типові характеристики зростання. Для ізоляції дисоціантів із організму жуків на 4-ту та 8-у добу комах п'ятикратно промивали в 0,9% розчині натрію хлориду після чого розтирали на предметному скельці. Отриманий гомогенізатор забарвлювали за методом Ціля-Нільсена й досліджували під імерсійною системою мікроскопа.

Наступним кроком встановлювали тривалість накопичення та виділення мікобактерій довгоносіками.

Для проведення дослідження створювали різні групи жуків:

- Дослідна – підлягала експериментальному інфікуванню шляхом утримання в контамінованому зависом дослідного штаму мікобактерій зерні пшениці з наступною пересадкою в стерильне зерно;
- Контрольна – інтактна група жуків, утримувалась в стерильному зерні та не піддавалась контакту з мікобактеріями.

Було проведено дві серії дослідів. У I серії був використаний дисоціативний штам (118-й пасаж) *M. bovis*, який не є патогенним для лабораторних тварин (мурчаків), основною задачею було встановити чи здатні дисоціанти відновлювати свої вірулентні властивості після пасажування через організм жуків. У II серії було використано вірулентний штам мікобактерій з метою визначення можливості зниження або підвищення вірулентності після проходження через організм комах.

Для контамінації зерна був приготовлений завис з дисоціативного штаму (118-ий пасаж, 240 генерація) – I серія та з вірулентного штаму (100 пасаж) *M. bovis* (II серія) у пропорції 10 мг бактеріальної маси в 1 см^3 ізотонічного 0,9% розчину натрію хлориду на кожні 10 г зерна, всього було використано 20 г зерна на кожний варіант, і, відповідно, 20 мг культури на 2 см^3 для I серії експерименту

та 80 г зерна, тобто 80 мг завису на 8 см³ фізіологічного розчину для II серії, що пов'язано з необхідністю більшої кількості зерна, яким на наступному етапі буде проводитися аліментарне інфікування лабораторних тварин.

У контаміноване дослідними штамами зерно пшениці розміщували імаго рисового довгоносика (по 50 жуків на кожний варіант) на 3 доби, на 4-ту добу жуків переміщували в стерильне зерно ще на 4 доби, з метою виключення механічної передачі мікобактерій. Після чого їх знов переносили в стерильне зерно до 12-ї доби досліду. Наступне переміщення робили на 20-ту добу, надалі жуків пересаджували кожні 10 діб до 90-ї доби, для встановлення тривалості носійства збудника, після чого даний етап експерименту завершується. Протягом 90 діб проводилось мікроскопічне дослідження довгоносиків та суспензії з зерна, на якому вони утримувались, а також висів на живильне середовище Мордовського («Нове») з рН 6,5/Stonebrink гомогенізату з жуків та суспензії зерна.

Контрольна група жуків протягом досліду утримувалась (і пересаджувалась) в чашках Петрі зі стерильним зерном і підлягала аналогічним до дослідної групи дослідженням із метою виключення виникнення спонтанного інфікування. Жуки та зерно, які залишились після проведення експерименту знезаражувались автоклавуванням протягом 3-х годин за 1,5 атм.

Дослідження зерна пшениці для встановлення участі жуків у перенесенні мікобактерій та їх здатності до контамінації об'єктів зовнішнього середовища:

Зерно пшениці, в якому знаходились жуки після кожного переміщення (в якому довгоносики перебували 4-90 діб, відповідно до методики), вносили в стерильну ступку й заливали стерильним ізотонічним 0,9% розчином натрію хлориду та витримували впродовж 30-ти хвилин у стерильному ламінарному боксі, після чого суспензували стерильним пестиком. З отриманої суспензії робили мазок, забарвлювали його за методом Ціля-Нільсена та висівали на 10 пробірок із живильним середовищем Мордовського («Нове»)/Stonebrink. Посіви інкубували за температури $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в умовах термостата та $3,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в умовах холодильника.

Дослідження жуків для встановлення їх як резервуарів збудника інфекції (визначення тривалості носійства):

Для проведення мікроскопічного дослідження відбирали жуків із дослідної та контрольної груп на 4-ту, 8-у, 12-ту та 20-ту добу і надалі кожні 10 діб до 90-ї доби (включно). Жуки промивались ізотонічним 0,9% розчином натрію хлориду 3-5 разів, залежно від попереднього результату, щоразу досліджуючи змиви методом мікроскопії. Після промивання жуків розтирали на предметному скельці, отриманий гомогенізатор забарвлювали за методом Ціля-Нільсена. Починаючи з 30-ї доби (з моменту припинення виділення мікобактерій довгоносики в зовнішнє середовище), кожні 10 діб попередньо промиті 3-5 разів жуки (по 3 шт) гомогенізували в стерильній ступці з додаванням стерильного 0,9% розчину натрію хлориду. Після чого проводилась мікроскопія мазків із гомогенізатора та висів приготовленої суспензії на середовище Мордовського («Нове)/Stonebrink.

Четвертим етапом дослідження було встановлення різниці ознак і властивостей мікобактерій після проходження через організм рисового довгоносика та вихідних штамів збудника.

Проведено визначення морфологічних ознак, культуральних, тинкторіальних та біохімічних властивостей культур, отриманих у результаті посіву на живильне середовище гомогенізатора з жуків та суспензії з зерна пшениці на якому утримувались дослідні довгоносики протягом експерименту (90 діб). Для вивчення ферментативної активності було накопичено субкультуру дослідних штамів шляхом прямого пересіву культур на живильне середовище Мордовського («Нове)/Stonebrink. Визначали каталазну, пероксидазну, дегідрогеназну й нітратредуктазну активність та здатність до гідролізу ТВІН-80.

За показниками колонієутворюючих одиниць оцінювали активність (життєздатність) культур отриманих після пасажування через організм рисового довгоносика.

Отримані дані порівнювали з показниками контрольних (вихідних) штамів. Контроль – вихідна музейна культура вірулентного (пасаж №100) та

дисоціативного (пасаж №118) штамів *M. bovis*, які не піддавались впливу внутрішнього середовища жуків.

2.3.6. Біологічне дослідження

На п'ятому етапі дослідження вивчали вірулентні та сенсibiliзуючі властивості вихідних штамів мікобактерій та культур отриманих у результаті посіву на живильне середовище Мордовського («Нове)/Stonebrink суспензії зерна пшениці контамінованої протягом дослідів довгоносіками та гомогенізатором з жуків. Експеримент проводили на морських свинках із масою тіла 250–350 г. До інфікування тварин витримували на карантині протягом 14 діб. За цей час тваринам проводили клінічний огляд, зважування та алергічне дослідження (туберкулінізацію) з метою виключення природного туберкульозу. Для туберкулінізації використовували робочий розчин ППД-туберкуліну для ссавців (25 МО в об'ємі 0,1 см³), який вводили внутрішньошкірно в зовнішній бік стегна. Місце інокуляції попередньо вистригали та дезінфікували 70%-им етиловим спиртом. Облік туберкулінізації визначали через 24 та 48 годин. Реакція вважалась позитивною у випадку появи гіперемії та набряку діаметром більше 5 мм або виразки в місці введення. Для подальшого дослідження допускали виключно тих мурчаків, які не реагували на введення алергену.

Для проведення біологічного дослідження (біопробы) лабораторних тварин поділяли на дослідні групи та контрольну (по 3 тварини в кожній групі). Мурчаків заражали підшкірно у внутрішню частину стегна (шкіру попередньо дезінфікували) зависом мікобактерій дослідних культур у кількості 1 мг мікробної маси на 1 см³ ізотонічного 0,9%-го розчину натрію хлориду. Контрольна група залишалась інтактною (Ткаченко і ін., 2010).

При постановці другої серії дослідів з патогенним штамом проводили також аліментарне інфікування мурчаків. Для цього аналогічно створювали дослідні та контрольну групи. Тваринам дослідних груп згодовували по 20 г зерна на якому знаходились жуки до кожної наступної пересадки. З цією метою мурчаків розміщували в стерильному боксі з дослідним зерном і утримували їх

у ньому до повного поїдання пшениці. Контрольна група вживала в цей період лише стерильне зерно.

Протягом дослід (90 діб) проводили щотижневий клінічний огляд та зважування тварин. На 30-ту, 60-ту та 90-ту добу визначали сенсibiliзуючі властивості дослідних штамів шляхом внутрішньошкірного введення робочого розчину ППД-туберкуліну для ссавців. Контрольна група також підлягала туберкулізації.

У разі відсутності загибелі лабораторних тварин протягом 90 діб, проводили їх евтаназію (розчином хлороформу). Результат біологічної проби оцінювали шляхом проведення патологоанатомічного, культурального, мікроскопічного та гістологічного дослідження.

Після проведення розтину визначали патологоанатомічні зміни в легенях, печінці, селезінці та лімфатичних вузлах.

Індекс туберкульозних уражень внутрішніх органів оцінювали за схемою Триус М.С., що описана Ященко & Мейчевою (1973). Згідно якої визначали ступінь уражень окремих органів і в організмі в цілому. Специфічні зміни визначали візуально й оцінювали плюсами: (+) - поодинокі вузлики; (++) – декілька вузликів; (+++) – численні вузлики. Плюсіві показники переводили у цифрові значення, де кожний плюс оцінювали за наступною схемою: в лімфатичних вузлах – 1; в селезінці – 2; в печінці – 3; в легенях – 4 бали. Відповідно, максимальний показник для лімфовузлів – 3 бали; селезінки – 6; печінки – 9; легень – 12. Підсумовуючи загальний бал, визначали індекс ураження організму (максимально 30 балів).

З внутрішніх органів робили мазки-відбитки, фіксували їх, забарвлювали за методом Ціля-Нільсена та передивлялась під мікроскопом. Крім того, з внутрішніх органів готували суспензію за методом Алікаєвої А.П. (1950). Згідно методики, внутрішні органи мурчаків подрібнювали на шматочки розміром 0,5 см³, розміщували їх в ступці та заливали 6%-им розчином сірчаної кислоти, витримували 10 хвилин, після чого розчин кислоти зливали. Біологічний матеріал двічі відмивали стерильним ізотонічним 0,9%-им розчином натрію

хлориду, витримуючи в розчині 5-7 хв. Розчин зливали, а шматочки тканин гомогенізували з додаванням невеликої кількості розчину натрію хлориду. З готової суспензії робили посіви на живильне середовище. Контроль росту посівів проводили щоденно.

Також відбирали шматочки уражених органів для проведення гістологічного дослідження. Біологічний матеріал для гістологічного дослідження отримували під час розтину та фіксували в 10% нейтральному розчині формаліну, з наступним промиванням у проточній воді, зневодненням етиловим спиртом зростаючої міцності, заведенням у ущільнююче середовище (гістопласт), виготовленням гістологічних зрізів з наступним забарвленням їх гематоксиліном та еозином і подальшим проведенням мікроскопії за загальноприйнятими у гістології методиками (Горальський і ін., 2019).

У розділі 2 використано матеріали з відповідним посиланням на такі наукові джерела зі списку літератури: [52; 99; 111; 162].

Розділ 3. Результати дослідження

3.1 Морфологічні особливості та біологічні властивості мікобактерій

Для проведення дослідження використано вірулентний (100-й пасаж) та дисоціативні штами *M. bovis* (117-а та 118 пасажі 240 генерації), які зберігались в музеї кафедри інфекційних хвороб тварин за температури $3,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Дисоціанти отримані методом багаторазового (116 і 117 разів відповідно) пересіву завису культури патогенного штаму *M. bovis* на свіже живильне середовище та довготривалого зберігання (20 місяців) в умовах низьких плюсових температур ($3,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$), внаслідок чого відбулось відщеплення авірулентних мікробних клітин від вірулентного штаму (Глебенюк, 2007; Кулішенко і ін., 2015, Ткаченко, 2017). Враховуючи, що для мікобактерій характерним є явище мінливості, яке зумовлює їх здатність кардинально змінювати ознаки та властивості бактеріальної клітини, на початковому етапі досліджень дослідні культури пересівали на живильне середовище Мордовського (“Нове”) з рН 6,5 (дисоціативні форми №117-а, 118 пасажі) та середовище Stonebrink (100-й пасаж) з метою накопичення біомаси для проведення наступних етапів досліду. Вперше використовувалось середовище Stonebrink для накопичення дослідного штаму. Визначали морфологію, тинкторіальні, культуральні, та біохімічні властивості вихідних культур та отриманих субкультур.

3.1.1. Морфологія, тинкторіальні властивості дослідних культур

За результатами, отриманими після пересіву культур на свіже живильне середовище, можна стверджувати, що отримані субкультури за дослідними показниками майже не відрізнялись від вихідних культур (додаток В).

Аналіз отриманих даних культуральних властивостей вихідних культур та отриманих субкультур свідчать, що в цілому дослідні штами мають стійкі властивості. Субкультури дисоціативних форм *M. bovis* (117-а та 118 пасажі) характеризувалися появою суцільного росту на середовищі по лінії посіву за

різних температурних режимів ($3,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$; $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$) Інтенсивність росту 117-а пасажу була помірною за температури $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$, натомість за $3,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$ ріст був пишним. Водночас ріст 118-го пасажу навпаки характеризувався помірним ростом за температури $3,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$, а при $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$ інтенсивність росту була більшою.

Зважаючи на час появи первинного росту в посівах визначили, що колонії формувалися швидше за $3,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$ у посівах субкультури 117-а пасажу та за $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$ у 118-го. В цілому, швидкість росту субкультури 117-а пасажу була вище в 1,1 (при $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$) – 1,3 (при $3,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$) рази. Слід зазначити, що швидкість появи первинного росту субкультури 118-го пасажу знизилась у 2,0 (при $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$) - 2,3 (при $3,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$) рази порівняно з вихідним штамом. Усі варіанти субкультур формували чисельні дрібні колонії по лінії посіву, за виключенням 118-го пасажу, які інкубували за $3,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$, колонії даного варіанту були крупними й поодинокими.

Форми колоній усіх дослідних культур була правильною, з гладенькою поверхнею (S-форма), всі варіанти здатні до пігментоутворення (від блідо-помаранчевого (118) до помаранчевого (117-а)), колонії в'язкі, матові та блискучі (рис 3.1а; 3.1б). Здатність дисоціантів до емульгації у фізіологічному розчині всіх дослідних зразків – задовільна.

Здатність до росту на простих живильних середовищах (МПА та МПБ) проявляли лише дисоціативні форми *M. bovis* (вихідні культури та субкультури). На МПА та МПБ ріст виявляли на другу добу за температури $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$ та на третю за $3,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$. В обох варіантах на МПА формувались гладенькі колонії з рівними краями сіруватого відтінку, на МПБ мікобактерії зумовлювали помутніння середовища та появу плівки на поверхні. Отримані дані можуть свідчити про набуття дисоціантами властивостей, які характерні атипичним мікобактеріям.

Вірулентний штам *M. bovis* проявляв первинний ріст через 14-16 діб за температури $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$, що в середньому на 53,6 % швидше за вихідний штам,

а при температурі $3,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$ ріст не спостерігався після пересіву завису мікобактерій на свіже живильне середовище Stonebrink. Однак, найбільш вірогідно, це пов'язано з більш придатним середовищем для культивування (вихідна культура зберігалась на середовищі Мордовського з pH 6,5, пересів здійснений на середовище Stonebrink, яке більш удосконалене та є на сьогоднішній день оптимальним для культивування мікобактерій).

За $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$ спостерігали ріст чисельних дрібних колоній помірної інтенсивності, неправильної форми, матові, з шорсткою поверхнею (R- форми) за консистенцією крихкі. Колонії непрозорі, здатні до пігментоутворення (колір слонової кістки), не здатні до емульгації у фізіологічному розчині, на простих живильних середовищах ріст відсутній (рис 3.1в).

А



Б



В



Рис. 3.1. Культуральні властивості музейних культур та отриманих із них субкультур: А – пасаж №117-а; Б – пасаж № 118; пасаж №100. 1 – вихідна культура; 2- субкультура отримана за температури $3,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$; 3 – субкультура отримана за температури $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$

Наступним етапом досліджували морфологію й тинкторіальні властивості вихідних культур (117-а, 118-й та 100-й пасажі *M. bovis*) і субкультур. Слід зазначити, що значних змін досліджуваних властивостей між вихідними культурами й отриманими субкультурами нами не виявлено (додаток Г).

Під час мікроскопічного дослідження мазків 117-а пасажу дисоціативного штаму *M. bovis* під імерсійною системою мікроскопа (x1600) з'ясували, що субкультури, які інкубувались за різних температурних режимів ($3,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$ та $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$) виявились ідентичними до вихідної культури. Морфологічно мікобактерії були представлені некислотостійкими прямими, короткими (≤ 1 мкм), тоненькими ($\leq 0,3$ мкм) паличками з заокругленими кінцями, які розміщувались переважно скупченнями, рідше поодинокі. Зернистість дисоціантів виражена, L-форми та елементарні тільця у мазках не виявлено (рис. 3.2а).

Мікобактерії 118-го пасажу представлені кислотостійкими зернами, поодинокими прямими паличками (у вихідній культурі), натомість у субкультурах виявлені виключно кислотостійкі зерна, із заокругленими кінцями, розташовані бактерії переважно невеликими скупченнями та поодинокі. Зернистість виражена слабо й не в усіх бактеріальних клітинах, оптична щільність поверхні мікобактерій – неоднорідна. L-форми та елементарні тільця відсутні (рис. 3.2б).

Вихідна культура вірулентного штаму *M. bovis* (100-й пасаж) та субкультура отримана за $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$ характеризувалась наступними морфологічними ознаками: при мікроскопії у мазках виявлено кислотостійкі короткі (≤ 1 мкм) прямі тонкі ($\leq 0,3$ мкм) палички із заокругленими кінцями, які розміщені поодинокі та скупченнями, мікробні клітини з вираженою

зернистістю, з різною оптичною щільністю. Не виявлено L-форми та елементарних тілець (рис. 3.2в).

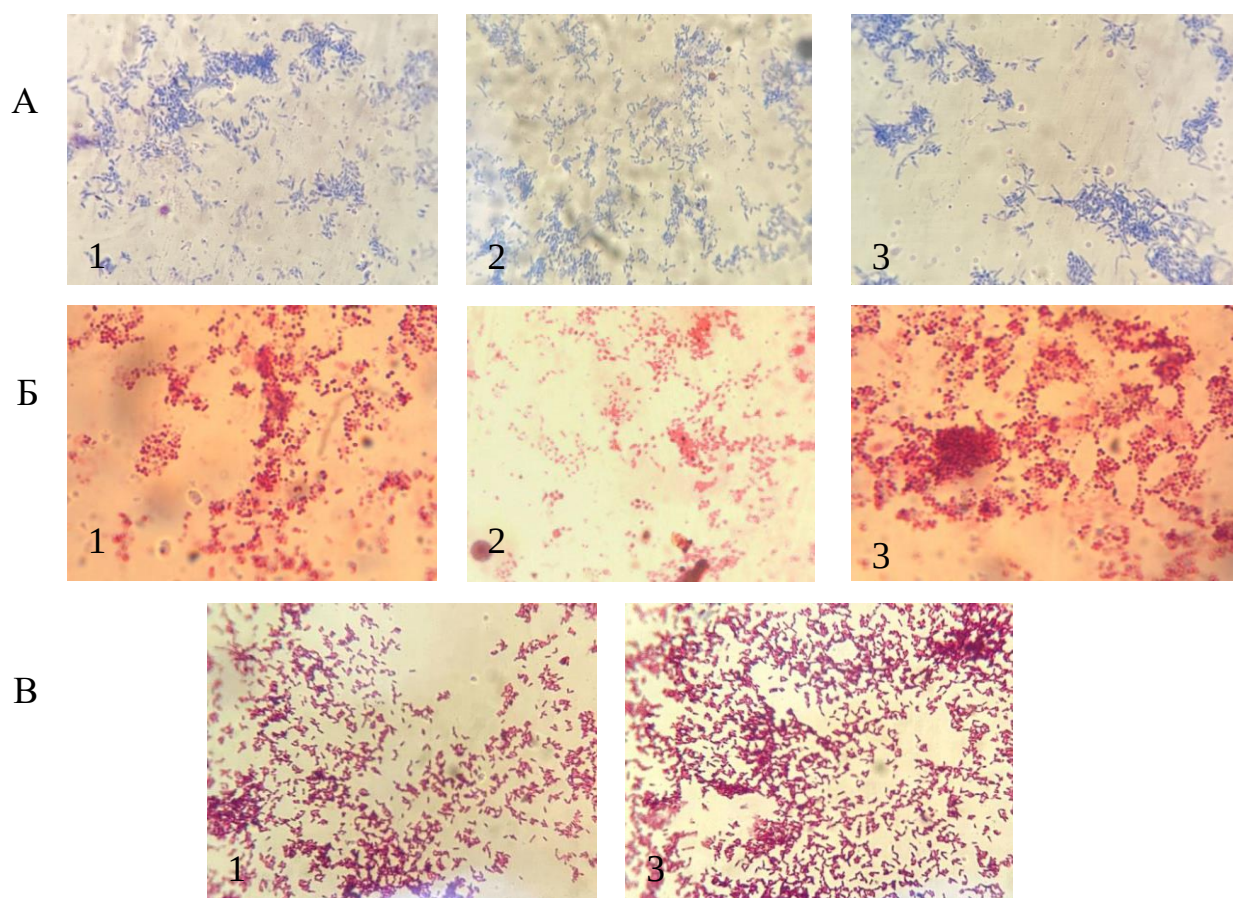


Рис. 3.2. Мікроскопія мазків музейних культур та отриманих із них субкультур:

А – пасаж №117-а; Б – пасаж № 118; пасаж №100 (1 – вихідна культура; 2 – субкультура, отримана за температури інкубування $3,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$; 3 – субкультура, отримана за температури інкубування $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$.

(забарвлення за Цілем-Нільсеном, $\times 1600$)

Аналізуючи морфологію, тинкторіальні й культуральні властивості, що представлені на рис. 3.1-3.2 та додатках В і Г, вихідних культур мікобактерій та отриманих шляхом пересіву бактеріального завису на свіже живильне середовище субкультур, можна стверджувати, що геном збудника досить стійкий і здатен зберігати основні біологічні властивості. Кислотостійкість проявляли вірулентний штам (пасаж №100) та 118 пасаж. Ріст субкультури дисоціативних форм в 2,0-4,6 разів швидший за ріст вірулентного материнського штаму. Досліджувані штами дисоціативних форм здатні рости за як за низьких

температур ($3,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$), так і в умовах термостату за температури $37,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, вірулентний штам лише за температури $37,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. При цьому, нами визначено, що більш сприятливими температурним режимом для 117-а пасажу було $3,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, а для 100-го та 118-го пасажу — $37,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, тому для подальшого дослідження культивування проводили дотримуючись оптимальної температури.

Для наступних етапів дослідження використовували отримані нами субкультури вихідних штамів вірулентного 100-го пасажу, дисоціативні пасажі №117-а та 118.

3.1.2. Ферментативні властивості дослідних штамів

При визначенні біохімічних властивостей дослідних культур, оцінювали наступну активність: каталазну, пероксидазну, дегідрогеназну, нітратредуктазну, здатність до гідролізу ТВІН-80. Результати висвітлені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Ферментативна активність дослідних штамів мікобактерій

Дослід- на культура	Каталазна активність		Пероксидазна активність	Дегідрогене- зна активність		Нітратредуктазна активність	Гідроліз ТВІН-80		
	15хв	30хв		15- 30хв	24 год		4год	5діб	10 діб
Пасаж №100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Пасаж №117-а	++	++	-	-	-	+	-	-	+
Пасаж №118	++	++	-	-	-	±	-	-	+

Примітка: (+) - позитивна реакція; (-) - негативна реакція; ($\pm$) - сумнівна реакція; для каталазної активності (визначення інтенсивності утворення пухирців): (+++) - рясне; (++) - помірне; (+) - поодинокі; (-) - відсутні.

Аналізуючи отримані дані бачимо, що ферментативна активність дисоціативних форм є більш вираженою порівняно з патогенним штамом.

Дисоціанти володіють помірною активністю каталази, проте не володіють пероксидазною й дегідрогеназною активністю, нітратредуктазна активність пасажу №117-а виявилась позитивною, а 118-го пасажу – сумнівною, що засвідчує поява ледве помітного жовтого забарвлення в дослідних пробірках. Здатність до гідролізу ТВІН-80 була негативною в штаммах *M. bovis* №№117-а та 118 через 4 години та 5 діб після постановки реакції, однак, через 10 діб реакція була позитивною, що виражалась в утворенні червоно-рожевого забарвлення.

При вивченні біохімічних властивостей вихідного вірулентного *M. bovis* не виявили прояв активності ферментів, що є характерним для патогенного штамів мікобактерій.

3.1.3. Визначення життєздатності дослідних культур

Життєздатність культур визначали методом підрахунку КУО в результаті проведення серійних розведень мікобактеріального завису. Обчислення життєздатних мікробних клітин патогенного штамів *M. bovis* проводили за 5-го розведення, культури дисоціантів 117-а пасажу в 10-му розведенні, а 118-го пасажу в 8-му розведенні. Визначили, що кількість колоній, які вирости зі штамів патогенних мікобактерій становила $236 \pm 18,38$ в $0,08 \text{ мг} \approx 8 \times 10^{-2} \text{ мг}$ культури, тобто в 1 гр $2950000 \approx 3,0 \times 10^6$ мікробних клітин.

Кількість КУО дисоціативного штамів 117-а пасажу обраховували в 10-му розведенні. Визначили, що в $0,0000256 \approx 2,6 \times 10^{-7} \text{ мг}$ культури кількість колоній дорівнювала $124 \pm 18,38$, тобто в 1 гр мікробної маси $484375000,0 \approx 4,8 \times 10^9$ життєздатних мікроорганізмів.

Обчислення життєздатних мікобактерій в культурі дисоціантів 118-го пасажу проводили за восьмого розведення. Визначили, що кількість колоній дорівнювала $338,0 \pm 29,7$ в $0,00064 \approx 6,4 \times 10^{-5}$ мг мікробної маси. Тобто в 1 гр культури $528125000,0 \approx 5,3 \times 10^8$ життєздатних бактерій (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Оцінка КУО дослідних штамів мікобактерій

Дослідні культури		Кількість вирослих колоній на живильному середовищі										M±m	Кіл-ть кул-ри в 1г бак маси
		Кратність розведення											
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VII I	IX	X		
М. bovis Віру л.	Зразок 1	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	249	Р.в .	Р.в .	Р.в.	Р.в .	Р.в .	236±18,3 8	3,0×10 ⁶
	Зразок 2	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	223	Р.в .	Р.в .	Р.в.	Р.в .	Р.в .		
117-а	Зразок 1	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	13 7	124±18,3 8	4,8×10 ⁹
	Зразок 2	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	11 1		
118	Зразок 1	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	317	Р.в .	Р.в .	338±29,7	5,3×10 ⁸
	Зразок 2	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	С.р .	359	Р.в .	Р.в .		

Примітки: с.р. – суцільний ріст на живильному середовищі; р.в. – ріст відсутній.

Визначено, що дослідні культури придатні для проведення наступних етапів дослідження. Водночас, спостерігаємо, що більшу кількість КУО містять дисоціативні форми, особливо 117-а пасаж, ніж патогенний штам.

3.2. Ідентифікація мікрофлори рисового довгоносика

На даному етапі проводили ідентифікацію симбіотної мікрофлори рисових довгоносиків, які були відібрані з зернових сумішей і були нестерильними. Нами проведені мікроскопічні, культуральні та біохімічні дослідження для встановлення родової належності мікроорганізмів. Перед розтиранням жуків п'ятикратно промивали в стерильному фізіологічному розчині.

При мікроскопічному дослідженні гомогенізату довгоносиків забарвлених за методом Ціля-Нільсена виявляли некислотостійкі (сині) коки, за Грамом - ГР⁺ коки (рис. 3.3).

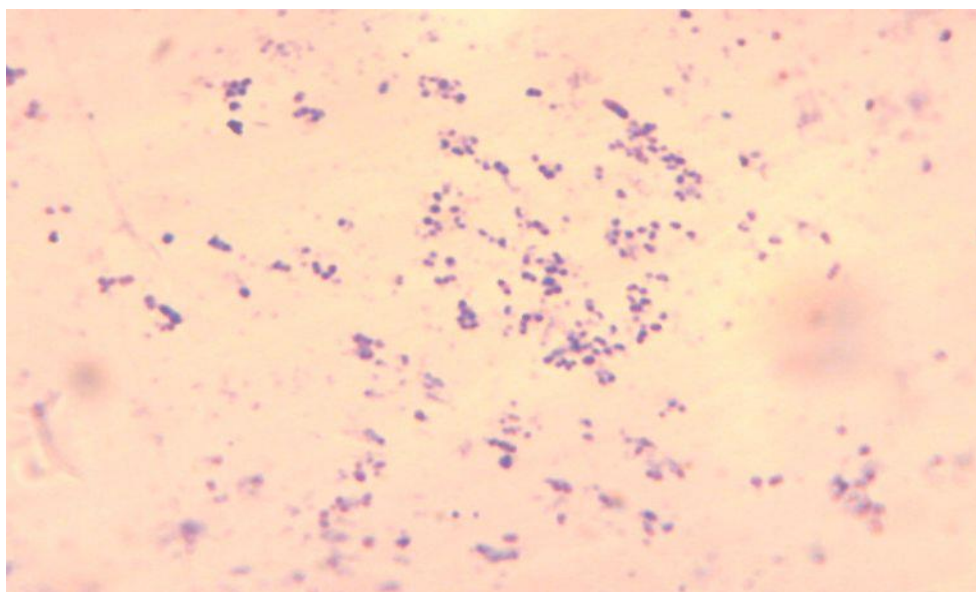


Рис. 3.3. Мазок з гомогенізату жука до експериментального інфікування (забарвлення за Цілем-Нільсеном, x1600)

При посіві гомогенізату з жуків на МПА, спостерігали появу росту на 2-3-тю добу при культивуванні за температури $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ у вигляді блідих кремово-рожевих округлих колоній S-форми діаметром 1,5-2 мм, з вираженим блиском. За температури $3,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ріст був відсутній. При мікроскопії мазків із культури забарвлених за Грамом спостерігали ГР⁺ коки, поодинокі палички, за методом Ціля-Нільсена – некислотостійкі коки, поодинокі палички.

При культивуванні на МПБ за температури $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ спостерігали помутніння та появу осаду на 2-3 добу після посіву. При перегляді мазків

забарвлених за методом Ціля-Нільсена виявлено некислотостійкі коротенькі палички без розгалужень, за Грамом – ГР⁺ палички.

При посіві на середовище Сабура та культивуванні при температурі $24,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ спостерігали суцільний ріст кремових колоній по лінії посіву. При мікроскопії мазків за методом Ціля-Нільсена виявляли некислотостійкі крупні овали, за Грамом – ГР⁺ крупні овали.

Посів гомогенізату на живильне середовище “Stonebrink” ріст був відсутній, а на середовищі Мордовського спричиняв появу росту на 7-11-ту добу, при культивуванні за температури $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, світлих жовтуватих округлих колоній S-форми (рис. 3.4). Мікроскопією мазків із вирослих колоній забарвлених за методом Ціля-Нільсена спостерігали некислотостійкі коки, за Грамом – ГР⁺ коки.

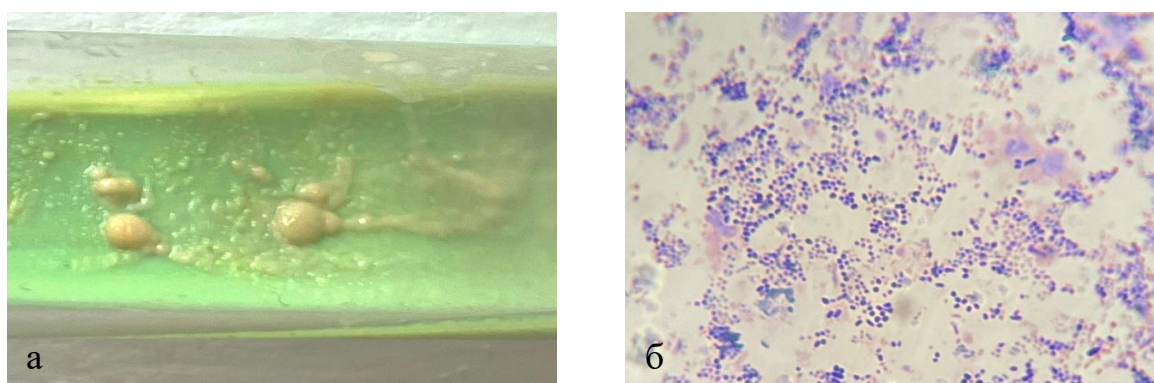


Рис. 3.4. Мікрофлора рисового довгоносика до інфікування: а – посів гомогенізату жука; б – мікроскопія вирослих колоній (забарвлення за Цілем-Нільсеном, $\times 1600$)

У культурі, отриманій на середовищі Мордовського визначали ферментативну активність. Встановили, що культура володіє помірною каталазною та пероксидазною активністю, здатна до редукції нітратів, гідролізує ТВІН-80, результат дегідрогеназної активності сумнівний, спостерігали часткове знебарвлення метиленового синього.

Отже, спираючись на результати культурально-морфологічних ознак та ферментативної активності, визначили, що дослідна культура відноситься до бактерій роду *Rhodococcus*.

3.3. Експериментальне інфікування рисового довгоносика мікобактеріями дослідних штамів

3.3.1. Визначення оптимальної дози для інфікування жуків

До проведення основного дослід з експериментальним інфікуванням жуків, нами визначено оптимальну дозу завису мікобактеріальної маси. З цією метою створено три групи жуків (по 20 шт в кожній). Кожну групу розмістили в чашках Петрі з попередньо проавтоклавованим й обробленим зависом мікобактерій (118-ий пасаж) в трьох варіаціях зерном. Після трьохдобової витримки на контамінованому субстраті, жуків піддавали мікроскопічному дослідженню.

Визначили, що концентрація мікобактеріальної маси 1 мг в 1 см³ 0,9% натрію хлориду на кожні 10 гр зерна, на якому утримувались дослідні жуки (група №1) є недостатньою для проведення наступних етапів дослідження. У мазках зі змивів 20-ти жуків виявили лише 9 довгоносиків (45%), які містили дослідні мікобактерії на поверхні свого тіла, а в мазках із гомогенізату – у 7-ми жуків (35%).

При мікроскопії жуків із групи №2, які утримувались на зерні, контамінованому зависом мікобактерій у концентрації 5 мг у 1 см³ 0,9% розчину натрію хлориду на кожні 10 гр субстрату, встановлено, що в мазках змивів із тіла виявлено дослідний штам збудника в 16-ти екземплярів (80%), а в мазках із гомогенізату – в 14-ти жуків (70%).

Результат мікроскопічного дослідження жуків із дослідної групи №3, які утримувалась в зерні, що оброблено зависом мікобактеріальної маси в концентрації 10 мг у 1 см³ 0,9% розчину натрію хлориду на кожні 10 г субстрату, продемонстрував, що в мазках змивів із поверхні тіла довгоносиків виявлено

дослідні мікобактерії в 20-ти жуках (100%), в мазках із гомогенізату – також 20 зразків (100%) містили мікобактерії.

З метою перевірки отриманих результатів провели повторне (контрольне) контамінування зерна зависом мікобактерій у концентрації 10 мг у 1 см³ 0,9% розчину натрію хлориду, контрольну групу жуків (20 шт) розмістили в чашках Петрі на 3 доби, після чого дослідили під мікроскопом змиви з поверхні тіла та гомогенізат довгоносиків. Отримані результати виявились ідентичними до результатів групи №3, тобто дослідні мікобактерії виявлено в змивах 20-ти жуків (100%) та гомогенізаті 20-ти (100%) довгоносиків (рис. 3.5).

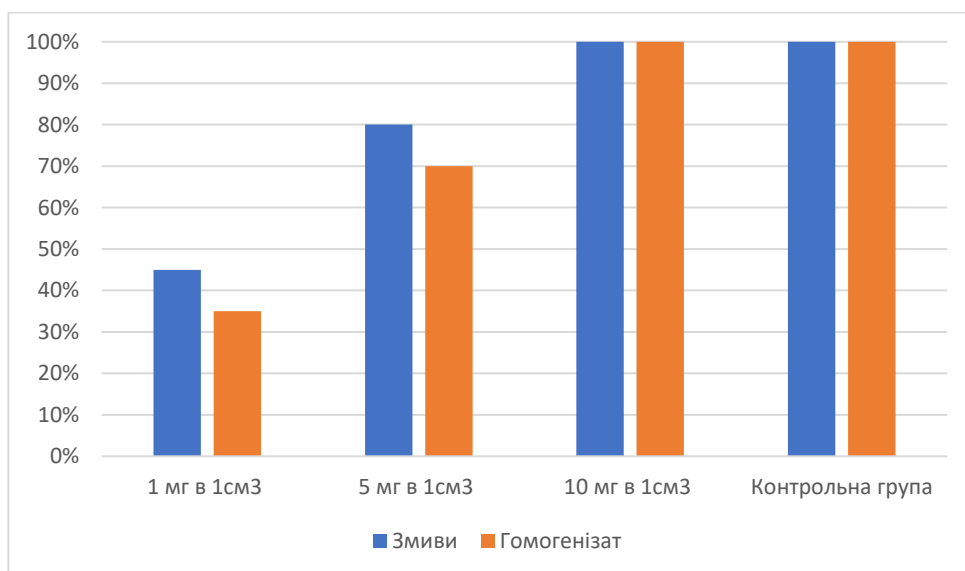


Рис. 3.5. Відсоток інфікованих жуків за різної концентрації мікобактеріального завису 118-го пасажу *M. bovis*

Аналогічним чином провели експеримент із патогенним штамом *M. bovis*. При мікроскопії мазків зі змивів із поверхні тіла жуків групи №1 (концентрація завису 1 мг у 1 см³ 0,9% розчину натрію хлориду) виявлено у 7-ми зразків (35%) дослідні мікобактерії, а в гомогенізаті в 4-ох жуків (20%).

При дослідженні групи №2 (концентрація мікобактеріального завису 5 мг у 1 см³ натрію хлориду) 17-ти жуків (85%) мали дослідні мікобактерії на поверхні тіла та 15-ти екземплярів (75%) в гомогенізаті.

Група №3 та контрольна показали ідентичні результати, дослідні мікобактерії виявлено у 20-ти зразках (100%) мазків змивів та гомогенізату (рис 3.6).

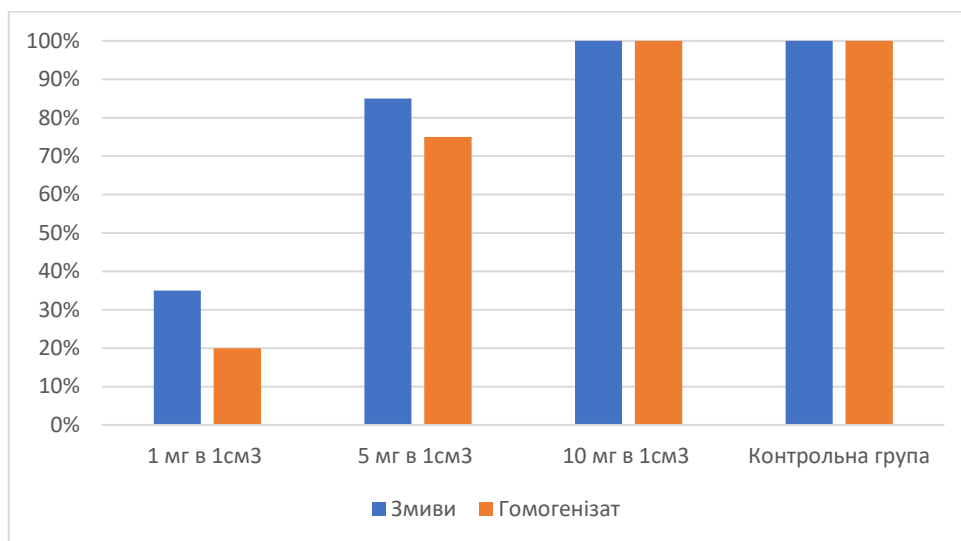


Рис. 3.6. Відсоток інфікованих жуків за різної концентрації мікобактеріального завису вірулентного 100-го пасажу *M. bovis*

Отже, аналізуючи результати експериментального контамінування різними дозами мікобактеріальної маси встановили, що оптимальною концентрацією є 10 мг завису мікобактерій в 1 см³ 0,9 % розчину натрію хлориду на кожні 10 гр субстрату. Дана концентрація забезпечує 100 % інфікування довгоносиків, які утримуються на контамінованому зерні. Таким чином, цю концентрацію ми використовували на наступних етапах дослідження.

3.3.2. Інфікування жуків

При проведенні мікроскопічного дослідження мазків зі змивів та гомогенізату 20% (10 жуків) наявних рисових довгоносиків до інфікування мікобактеріями, нами не виявлено кислотостійкої мікрофлори у жодному дослідному зразку експериментальної групи, що виключає природне носійство *M. bovis* у них.

3.3.2.1. Встановлення здатності рисового довгоносика до механічного перенесення мікобактерій

На цьому етапі дослідження встановили здатність комах переносити життєздатного збудника на поверхні свого тіла. Для досягнення мети використано дисоціативний штам *M. bovis* 117-а пасаж. Після розміщення довгоносиків у контаміноване зерно, на 4-ту та 8-му добу відібрано в рандомному порядку по чотири жука, які були перенесені в пробірки з живильним середовищем Мордовського (рН 6,5), на якому вільно пересувались, з наступним культивуванням пробірок за температури $3,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (рис. 3.7).

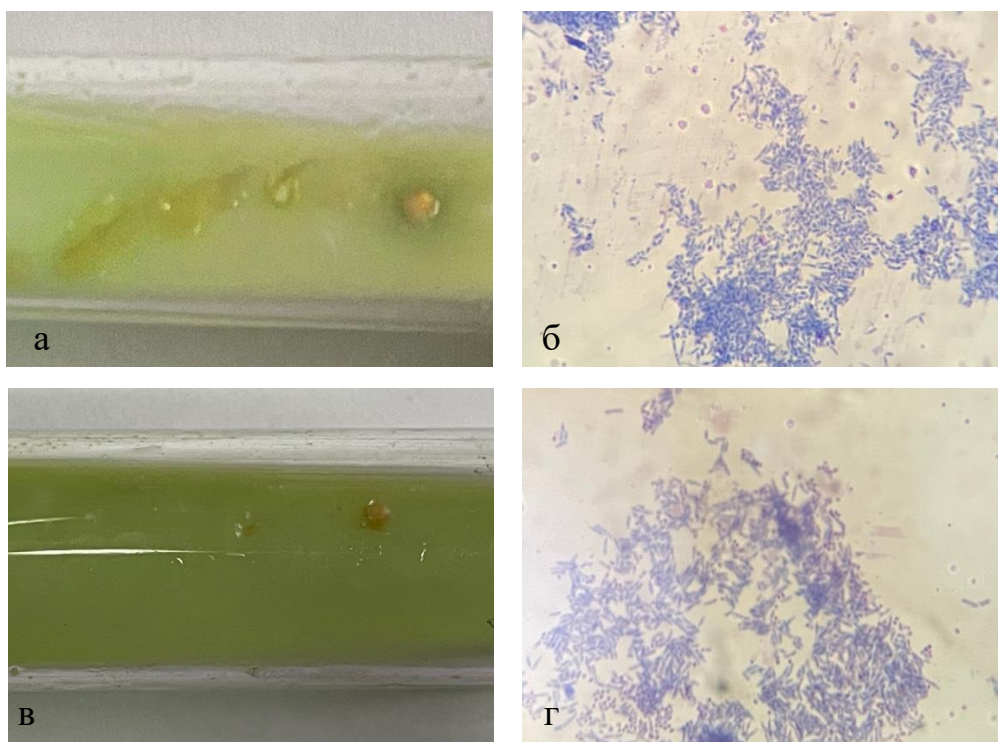


Рис. 3.7. Механічне перенесення рисовим довгоносіком мікроорганізмів: а – ріст на живильному середовищі після 4-х діб перебування жука на контамінованому зерні; б- мікроскопія вирослих колоній після 4-х діб перебування жука на контамінованому зерні; в – ріст на живильному середовищі після 8-и діб перебування жука на контамінованому зерні; г- мікроскопія вирослих колоній після 8-и діб перебування жука на контамінованому зерні (забарвлення за Цілем-Нільсеном, x1600)

Отримали наступні результати: ріст дослідного штаму виявлено в 8-ми пробірках (100%), первинний прояв росту зафіксовано на 5-6-ту добу, що триваліше на 25% порівняно з прямим пересівом культури.

З гомогенізату комах виготовляли мазки та забарвлювали їх за методом Ціля-Нільсена. За результатами дослідження при визначенні здатності до накопичення рисовим довгоносом мікобактерій, під час мікроскопії мазків виготовлених з гомогенізату, виявили наявність мікроорганізмів ідентичних за морфологічними ознаками вихідній культурі у 7-ми екземплярів (87,5%) жуків, 3 шт з яких на 4-ту добу й 4 шт на 8-му добу (рис. 3.8).

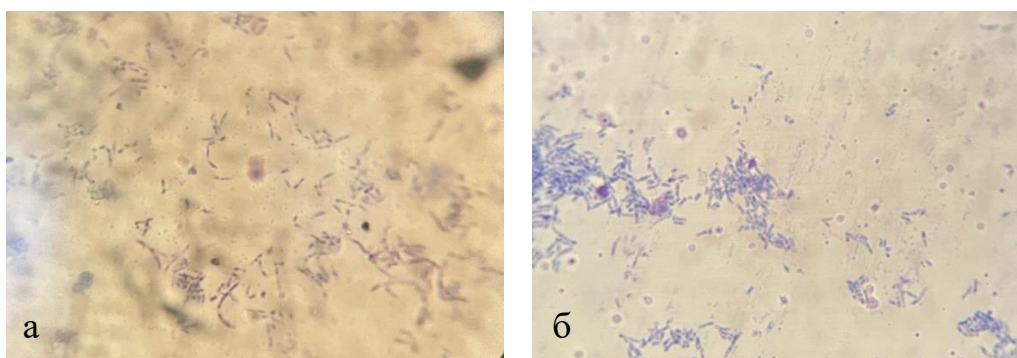


Рис. 3.8. Мікроскопія мазку з гомогенізату: а – на 4-ту; б – на 8-му добу після інфікування (забарвлення за Цілем-Нільсеном, x1600)

Ідентичність морфології мікробних клітин після пасажування через жуків із вихідним штамом може свідчити про те, що його організм є сприйнятливим середовищем для мікобактерій. Відсутність дослідних мікроорганізмів у кишковому тракті деяких екземплярів ми пов'язуємо з тим, що конкретними комахами не поїдалось контаміноване зерно.

3.3.2.2. Визначення тривалості мікробоносійства жуками (тривалість перебування збудника в організмі рисового довгоносика)

При встановленні тривалості носійства жуками мікобактерій визначали період ізоляції збудника з поверхні тіла довгоносика (змиви) та всередині самого організму комах (гомогенізат).

За результатами експерименту встановлена здатність до тривалого резервування мікобактерій в організмі рисового довгоносика. Зокрема, при проведенні I серії дослідження (інфікування дисоціативним штамом *M. bovis* 118-го пасажу) отримали наступні дані тривалості виділення мікобактерій зі змивів (мікроскопічно досліджували змиви 3-5 разів залежно від попереднього результату). На 4-ту та 8-му добу після інфікування досліджуючи мазки зі змивів жуків виявляли кислотостійкі зерна (дослідний штам *M. bovis*) до третього промивання включно, а некислотостійкі коки (мікроорганізми роду *Rhodococcus*, носіями яких комахи були до експерименту) до четвертого. На 12-ту, 20-ту та 30-ту добу дослідний штам виявляли до другого промивання включно, а *Rhodococcus* spp. до третього. Мікроскопічним дослідженням мазків змивів на 30-ту, 40-у та 50-ту добу експерименту дисоціативні форми виявлені лише після першого промивання, а некислотостійкі коки до третього промивання на 30-ту та 40-у добу й до другого на 50-ту добу досліді. При дослідженні змивів на 60-ту, 70-ту, 80-ту та 90-ту добу дослідження не виявлено дослідний штам у жодному мазку, однак у змивах на 60-ту добу після другого промивання та на 70-ту добу після першого промивання виявлено поодинокі родококи.

Отже, до 50-ї доби виявлялись в змивах дослідні мікобактерії, якими були інфіковані жуки на початку експерименту та до 70-ї доби некислотостійкі коки, носіями яких жуки були до інфікування. Разом з тим відмічаємо тенденцію до поступового зменшення кількості мікроорганізмів в полі зору мікроскопа (рис. 3.9).

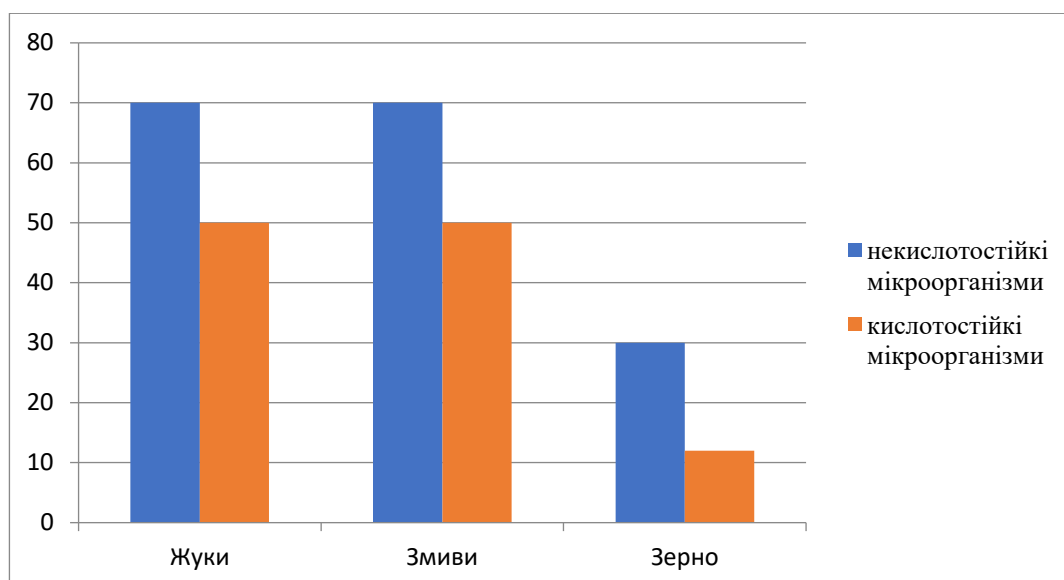
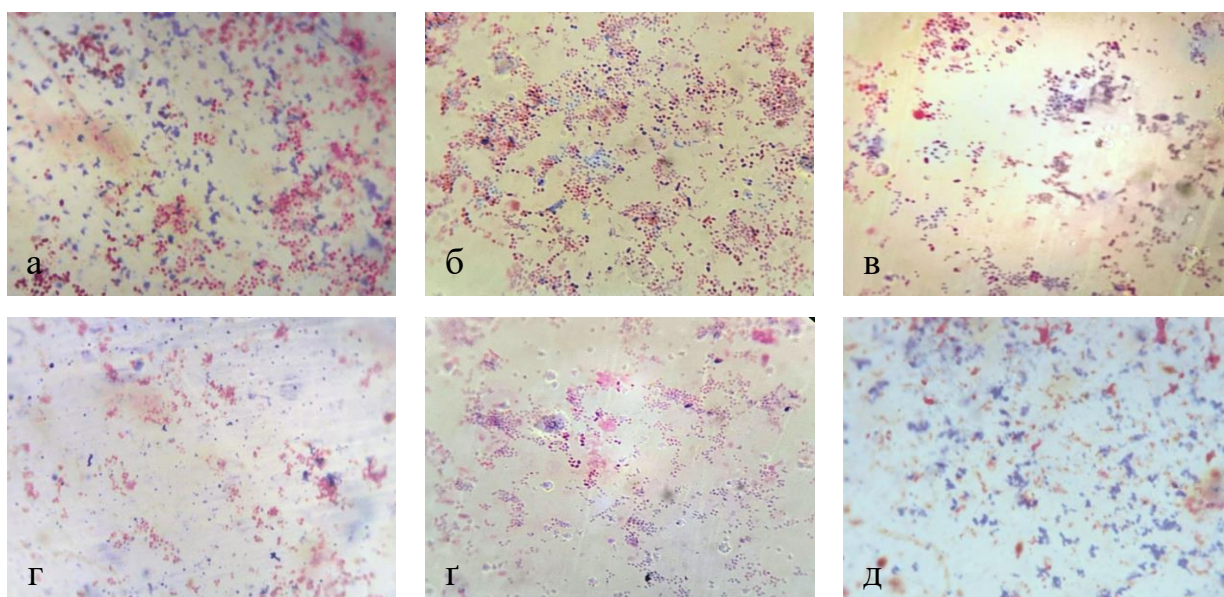


Рис. 3.9. Тривалість ізоляції мікроорганізмів із дослідного матеріалу (доба) методом мікроскопії

Під час проведення мікроскопії мазків із гомогенізату інфікованих жуків аналогічно до 50-ї доби в їх організмі виявляли дослідні форми *M. bovis* (червоні зерна), якими була контамінована пшениця на початку експерименту та сині коки, тобто некислотостійкі мікроорганізми (*Rhodococcus* spp.), носіями яких жуки були до інфікування. Відмічали тенденцію до поступового зменшення кількості мікроорганізмів в полі зору мікроскопа, особливо помітно з 20-ї доби дослідження (рис. 3.10).



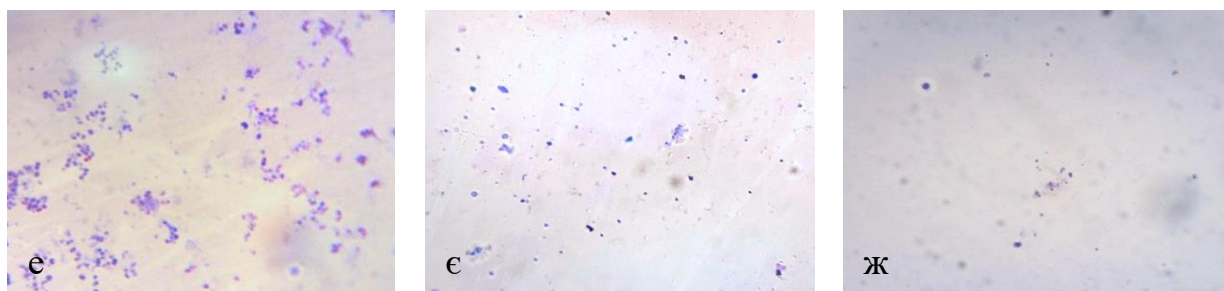


Рис. 3.10. Мікроскопія мазків з гомогенізату: а – на 4-ту; б – на 8-му; в – на 12-ту; г – на 20-ту; ґ – на 30-ту; д – на 40-у; е – на 50-ту; є – на 60-ту; ж – на 70-ту добу після інфікування (зabarвлення за Цілем-Нільсеном, х1600)

Щоразу окремо досліджували гомогенізат з трьох екземплярів жуків відібраних випадково з різних ділянок чашки Петрі. При мікроскопії на 4-ту, 8-му, 12-ту, 20-ту та 30-ту добу після інфікування ми виявляли дослідні мікобактерії у 100% жуків, на 40-у в двох жуків (66,7%), на 50-ту добу лише в мазку з одного жука (33,3%), що, в свою чергу, може свідчити про варіацію тривалості резервування мікобактерій у організмі рисового довгоносика, разом з тим, відсоток виділення бактерій не є абсолютним і може нести суб'єктивний характер, оскільки ми не можемо стверджувати, яку кількість мікробних клітин було захоплено кожним жуком. При цьому загальна закономірність є помітною (рис. 3.11)

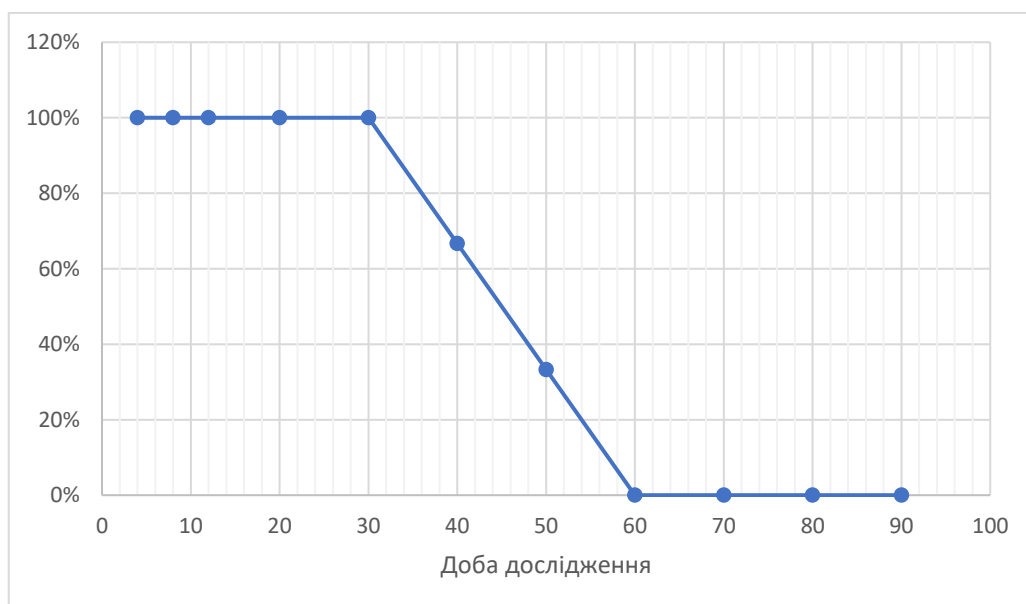


Рис.3.11. Відсоток виділення дослідних форм *M. bovis* у мазках з
гомогенізату жуків у динаміці досліді

З 60-ї доби експерименту в дослідних зразках не виявлені бактерії, що ідентичні до культури мікобактерій дисоціантів, яку досліджували, натомість, до 70-ї доби ще виявлялись некіслотостійкі родококи (рис. 3.10є; 3.10ж). На 80-ту та 90-ту добу під час проведення мікроскопічного дослідження будь-які мікроорганізми були відсутні (табл.3.3).

Таблиця 3.3 – Інтенсивність виявлення в мазках дисоціативних форм
M. bovis зі змивів і гомогенізату дослідних довгоносики

Доба дослідження	Наявність дослідних мікобактерій у змивах, кратність розведення					Наявність дослідних мікобактерій у гомогенізаті з жуків
	I	II	III	IV	V	
4	+++	++	+	-	-	+++
8	++	++	+	-	-	+++
12	++	+	-	-	-	+++
20	+	+	-	-	-	++
30	+	+	-	-	-	++
40	+	-	-	-	-	+
50	+	-	-	-	-	+
60	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-

Примітка: (+++) – щільне розміщення мікобактерій у мазку в полі зору мікроскопа; (++) – помірна; (+) – низька щільність; (-) – мікобактерії в мазку відсутні.

Паралельно з мікроскопічним дослідженням, гомогенізатор із промитих жуків висівали в пробірки з живильним середовищем Мордовського з рН 6,5 на 30-ту, 40-ту, 50-ту, 60-ту, 70-ту, 80-ту, та 90-ту добу після інфікування.

На 30-ту добу експерименту реєструвався ріст (на 12-ту добу після посіву) округлих гладеньких помаранчевих колоній з рівними краями ідентичних до вихідної культури (червоні зерна при мікроскопії) та ріст (на 8-му добу) світлих жовтуватих округлих колоній S-форми (сині коки при мікроскопії) – *Rhodococcus spp.* (рис. 3.12).

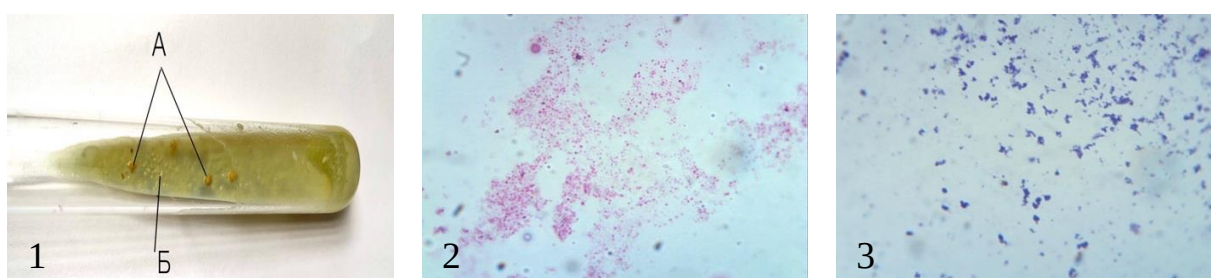
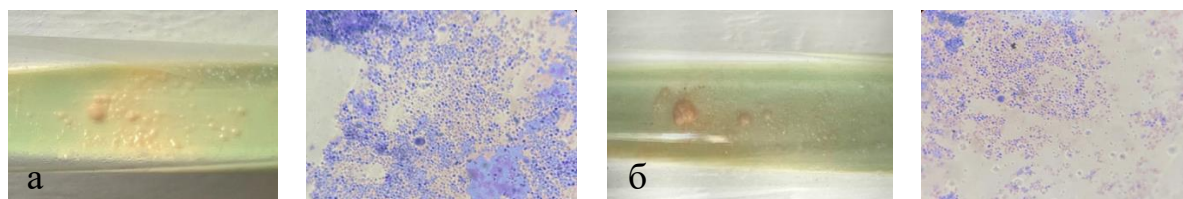


Рис. 3.12. Посів гомогенізата з рисового довгоноса на 30-ту добу після інфікування: 1 – ріст на живильному середовищі (а – дисоціативні форми *M. bovis*; б – *Rhodococcus spp.*); 2 – мікроскопія вирослих колоній *M. bovis*; 3 – мікроскопія вирослих колоній *Rhodococcus spp.* (забарвлення за Цілем-Нільсеном, x1600)

На 40-90-ту добу експерименту на живильному середовищі відмічали ріст тільки світлих жовтуватих колоній S-форми колоній на 13-22-у добу досліду (некислотостійкі коки при мікроскопії), ріст дослідних форм був відсутній. (рис. 3.13)



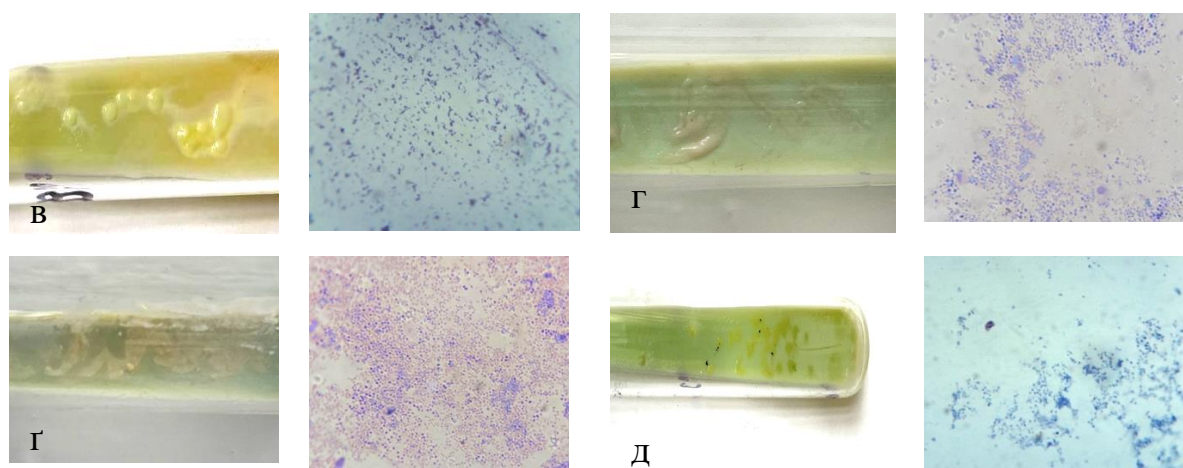


Рис.3.13. Культуральні властивості та морфологія культур виділених на 40-90-ту добу після інфікування комах : а – на 40-у; б – 50-ту; в – 60-ту; г – 70-ту; г – 80-ту; д – 90-ту (забарвлення за Цілем-Нільсеном, x1600)

Спираючись на тривалість виявлення дослідних мікобактерій у мазках із гомогенізату жуків (50 діб) та росту на живильному середовищі (30 діб), можемо стверджувати про втрату життєздатності виявлених у мазках мікробних клітин через 30 діб після інфікування жуків.

При експериментальному інфікуванні рисових довгоносиків у II серії дослідження було використано 100-й пасаж вірулентного штаму *M. bovis*. При дослідженні мазків зі змивів із тіла жуків забарвлених за методом Ціля-Нільсена під імерсійною системою мікроскопа нами виявлено кислотостійкі палички на 4-ту добу експерименту до четвертого промивання включно; на 8-му добу мікобактерії виявляли до третього промивання; на 12-ту – до другого та на 20-ту – лише в змивах після одноразового промивання.

При мікроскопії змивів на 30-90-ту добу *M. bovis* виявлено не було в жодному зразку. Тобто, в змивах ми виявляли кислотостійкі палички до 20-ї доби включно, відмічаючи поступове зменшення їх кількості в полі зору (рис. 3.14).

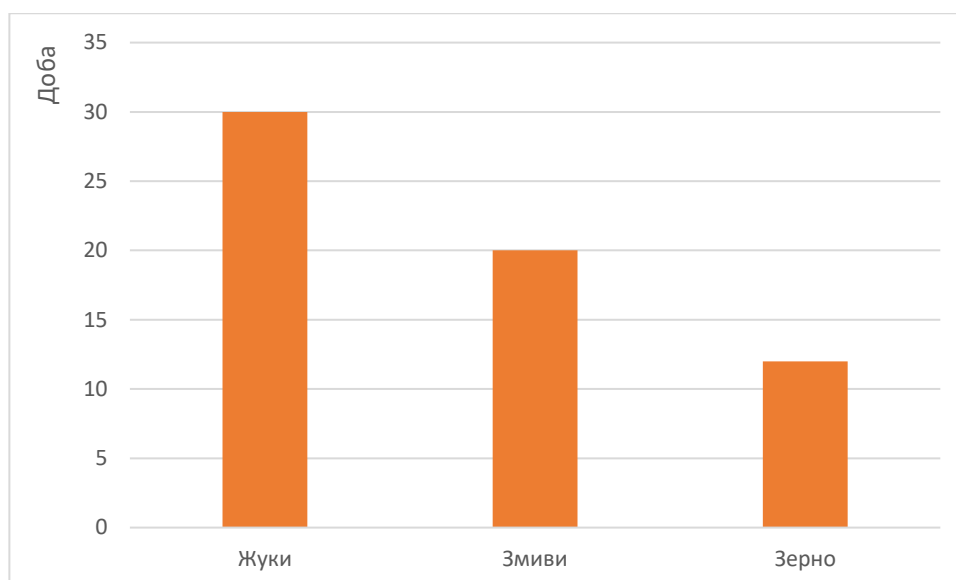


Рис. 3.14. Тривалість ізоляції *M. bovis* в мазках із дослідного матеріалу (доба) методом мікроскопії

При дослідженні мазків із гомогенізованих жуків, виявляли кислотостійкі палички до 30-ї доби досліді включно (рис. 3.14; 3.15).

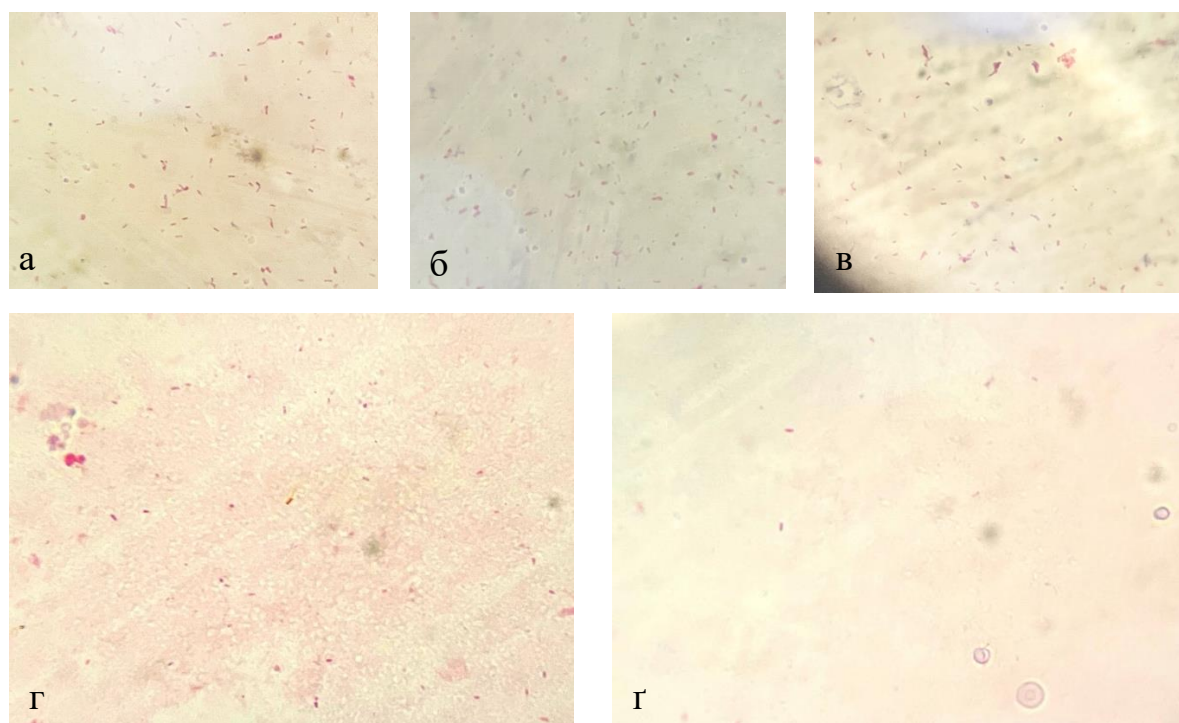


Рисунок 3.15. Мікроскопія мазків з гомогенізату жуків: а – на 4-ту; б – на 8-му; в – на 12-ту; г – на 20-ту; г – на 30-ту добу після інфікування (зabarвлення за Цілем-Нільсеном, x1600)

Тенденція до зменшення кількості мікобактерій у полі зору мікроскопа відмічалася з кожним наступним перенесенням жуків у стерильне зерно, особливо з 12-ї доби експерименту (табл.3.4).

Таблиця 3.4 – Виділення вірулентного штаму *M. bovis* зі змивів і гомогенізату дослідних довгоносиків

Доба дослідження	Наявність дослідних мікобактерій у змивах, кратність розведення					Наявність дослідних мікобактерій у гомогенізаті з жуків
	I	II	III	IV	V	
4	+++	++	++	+	-	+++
8	++	++	+	-	-	+++
12	+	+	-	-	-	++
20	+	-	-	-	-	+
30	-	-	-	-	-	+
40	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-

Примітка: (+++) – щільне розміщення мікобактерій у мазку в полі зору мікроскопа; (++) – помірна; (+) – низька щільність; (-) – мікобактерії в мазку відсутні.

Досліджуючи мазки з гомогенізату інфікованих жуків, на 4-ту, 8-у, 12-ту добу після початку експерименту кислотостійкі палички виявлено в трьох екземплярах (100%), на 20-ту та 30-ту – в двох довгоносиків (66,7%), що аналогічно до результатів I серії досліду вказує на ймовірну пластичність тривалості утримання збудника всередині організму та ймовірну різницю в кількості захоплених мікробних клітин (рис. 3.16).

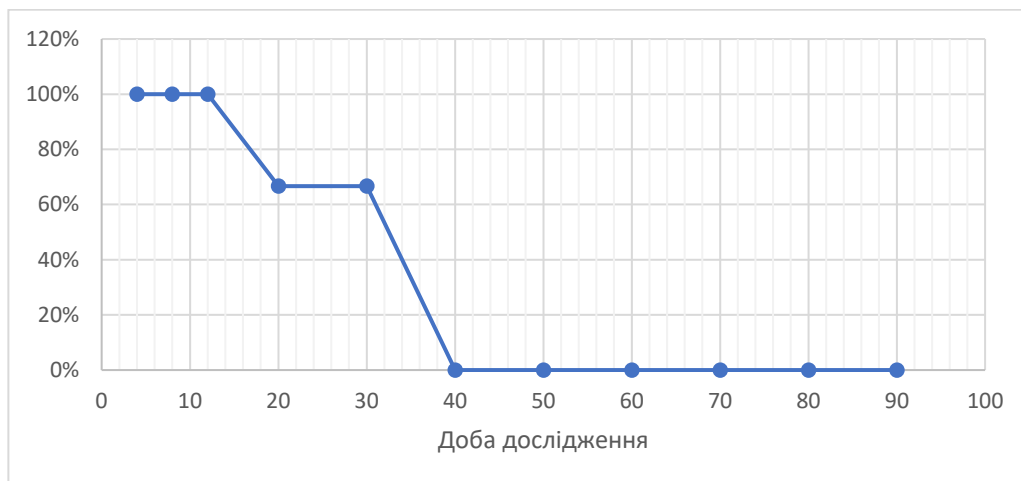


Рис. 3.16. Відсоток виділення дослідних форм *M. bovis* у мазках з гомогенізату жуків у динаміці дослідження

Водночас, починаючи з 30-ї доби експерименту, кожні 10 діб гомогенізат із жуків висівали на живильне середовище «Stonebrink», пробірки інкубували за $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ з щоденним оглядом. Відмічали ріст культури в пробірках, що були засіяні на 30-ту добу експерименту (прояв росту реєстрували на 18-ту добу). Морфологія та культуральні властивості колоній були ідентичними до вихідного штаму (рис. 3.17). Ріст посівів на 40-90-ту добу не спостерігався, що свідчить про вивільнення організму рисового довгоносика від мікобактерій.

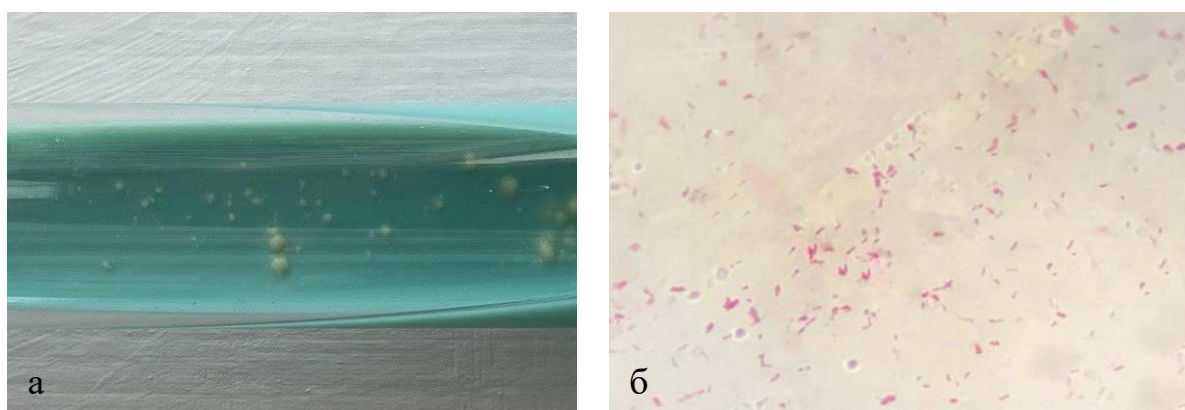


Рис. 3.17. Посів гомогенізата з рисового довгоносика на 30-ту добу після інфікування: а – ріст на живильному середовищі; б – мікроскопія вирощених колоній (забарвлення за Цілем-Нільсеном, $\times 1600$)

Отже, результати свідчать про здатність жуків накопичувати мікроорганізми в своєму організмі впродовж досить тривалого часу та бути резервуаром збудника.

3.3.2.3. Визначення тривалості виділення жуками мікобактерій та контамінації об'єктів зовнішнього середовища

У I серії експерименту при мікроскопічному дослідженні зерна, на якому утримувались дослідні жуки на 4-ту добу, тобто після однієї пересадки довгоносиків виявлено переважно кислотостійкі (червоні) зерна, що є ідентичними за морфологією до дослідного штаму дисоціативних форм *M. bovis* та поодинокі сині коки (ідентичні до *Rhodococcus* spp., носіями яких жуки були до початку експерименту). На 8-у та 12-ту добу, тобто після другої та третьої пересадки жуків відповідно, при мікроскопії виявлені кислотостійкі зерна та некислотостійкі коки. Надалі в пшениці не виявляли бактерії, які були б ідентичними до культури дисоціантів, яку досліджували. Проте під час мікроскопічного дослідження пшениці на 20-ту та 30-ту добу, в полі зору були виявлені некислотостійкі коки (*Rhodococcus* spp.). При мікроскопії на 40-90-ту добу, тобто з шостої до одинадцятої пересадки включно, мікроорганізмів у полі зору мікроскопа не було виявлено (рис. 3.9)

Отже, кислотостійкі дослідні форми мікобактерій виявлені до 12-ї доби досліду (тобто до третьої пересадки жуків включно), а некислотостійкі – до 30-ї доби включно (тобто до п'ятої пересадки).

При посіві суспензії з зерна на живильне середовище Мордовського (рН 6,5) на 4-ту добу, тобто після однієї пересадки жуків, виявлено ріст чисельних помаранчевих округлих колоній з рівними краями, які при проведенні мікроскопічного дослідження мають вигляд червоних зерен (ідентичних до вихідної культури) на 12-ту добу після посіву та ріст однієї світлої жовтуватої округлої колонії S-форми (*Rhodococcus* spp., сині коки при мікроскопії).

На 8-у, 12-ту, 20-ту та 30-ту добу досліду (тобто після другої-п'ятої пересадки жуків) на живильному середовищі виявлено ріст дисоціативних

дослідних форм *M. bovis* (червоні зерна при мікроскопії) на 16-40-у добу після посіву та ріст світлих жовтуватих округлих колоній S-форми – *Rhodococcus* spp., сині коки при мікроскопії (рис. 3.18).

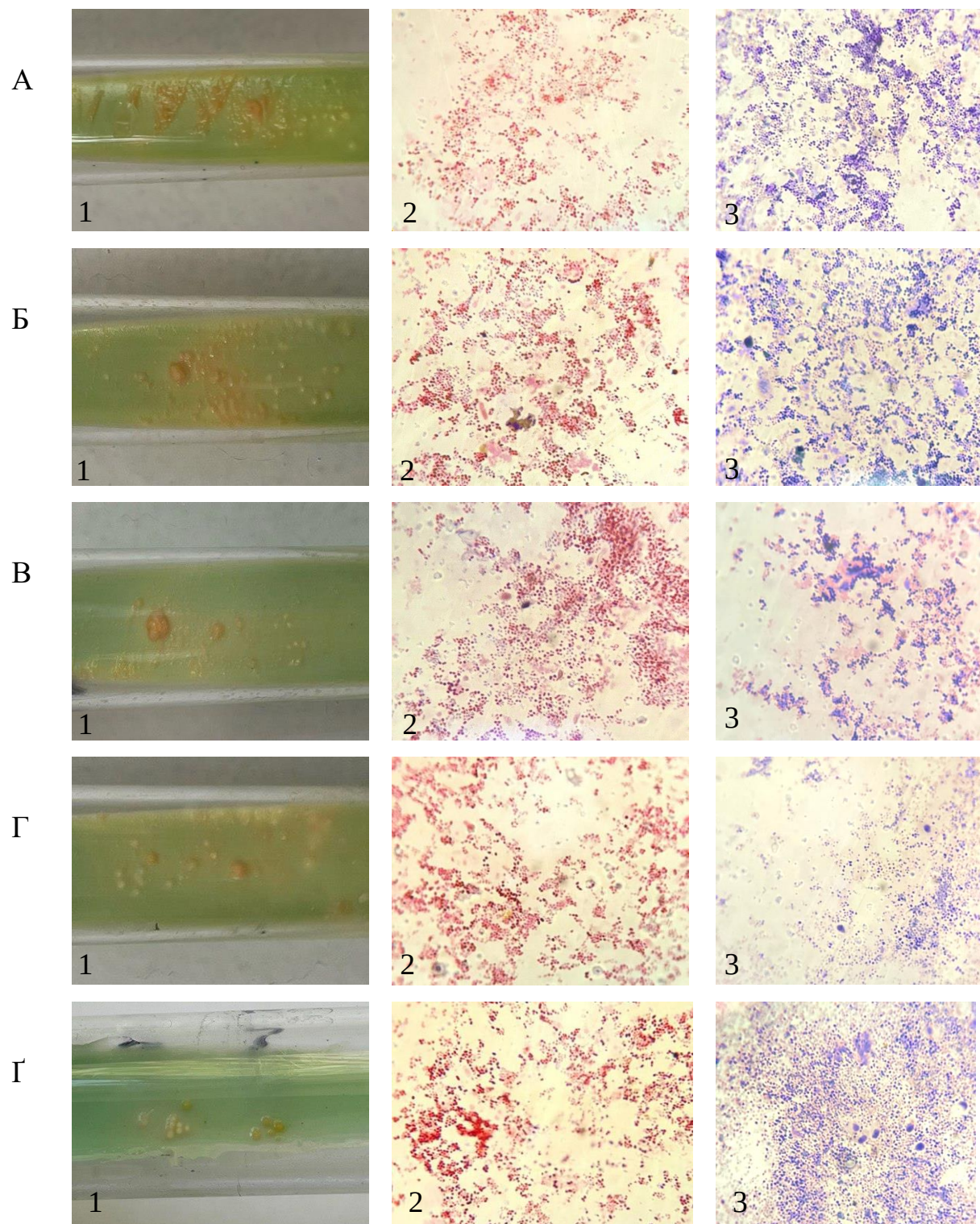


Рис. 3.18. Культуральні властивості та морфологія культур виділених із зерна на 4-30-ту добу після інфікування комах : а – на 4-ту; б – 8-у; в – 12-ту; г – 20-ту; г – 30-ту.

1 – ріст на живильному середовищі; 2 – мікроскопія вирослих колоній *M. bovis*;
3 – мікроскопія вирослих колоній *Rhodococcus spp.* (забарвлення за Цілем-Нільсеном, x1600)

При посіві суспензії на 40-у та 50-ту добу експерименту (тобто після шостої-сьомої пересадки) виявлено ріст тільки *Rhodococcus spp.*, а ріст ідентичних до дослідних культур відсутній. При посіві суспензії із зерна на 60-90-ту добу (після восьмої-одинадцятої пересадки довгоносиків) – росту не виявлено.

Враховуючи, що тривалість виділення кислотостійких зерен *M. bovis* та некислотостійких коків *Rhodococcus spp.* була неоднаковою, можна припустити, що термін виділення дисоціантів був менш тривалим внаслідок меншої кількості дослідних бактерій в організмі довгоносиків.

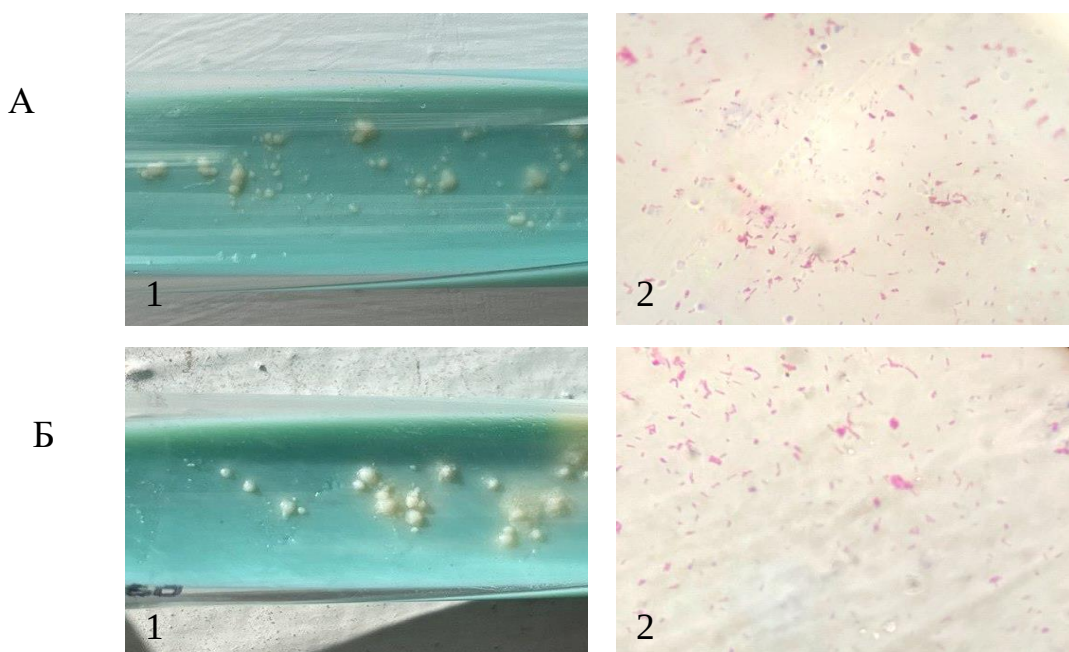
При мікроскопічному дослідженні суспензії з зерна в якому утримувались довгоносики в II серії експерименту встановлено, що на 4-ту; 8-у та 12-ту добу, тобто після однієї-трьох пересадок жуків, виявлено в мазках кислотостійкі палички, які є ідентичними за морфологічними ознаками до вихідного штаму *M. bovis*. У мазку з суспензії після однієї пересадки виявлено мікобактерії, які розташовані щільно, а в мазках, що виготовлені з суспензії зерна після другої та третьої пересадки збудник розміщувався поодинокі (Рис. 3.19).



Рис. 3.19. Морфологія мікобактерій, що виявлені в мазку з суспензії з : а – після однієї пересадки; б – двох; в – трьох пересадок жуків (зabarвлення за Цілем-Нільсеном, x1600)

При огляді мазків на 20-90-ту добу (після четвертої-одинадцятій пересадки довгоносиків) дослідних мікобактерій в полі зору мікроскопа не виявлено (рис. 3.14). Отримані дані співпадають з I серією експерименту.

Одночасно висівали суспензію з зерна на живильне середовище Stonebrink. При посіві суспензії з зерна після однієї пересадки довгоносиків, на 14-ту добу виявили ріст численних колоній по лінії посіву, які за культуральними властивостями ідентичні до вихідної культури, при проведенні мікроскопічного дослідження – кислотостійкі палички. Після другої-четвертої пересадок (тобто на 8-у, 12-ту та 20-ту добу експерименту) на середовищі відмічали первинний прояв росту колоній на 17-24 добу спостереження (рис. 3.20).



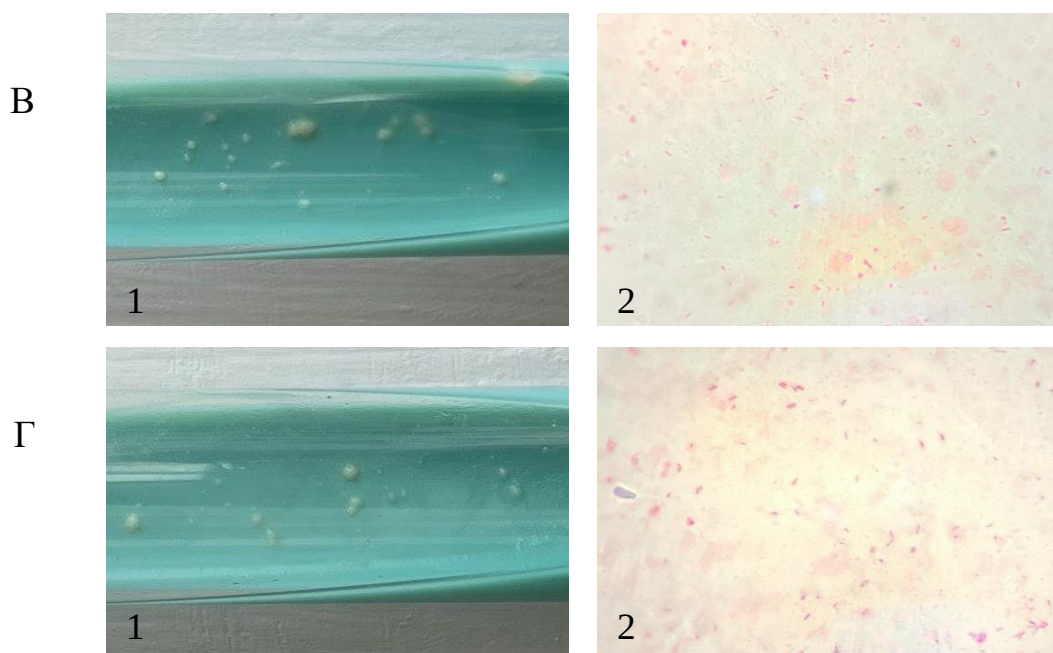


Рис. 3.20. Культуральні властивості та морфологія культур виділених на 4-20-ту добу після інфікування комах : а – на 4-ту; б – 8-у; в – 12-ту; г – 20-ту; 1 – ріст на живильному середовищі; 2 – мікроскопія виростлих колоній (забарвлення за Цілем-Нільсеном, x1600)

У посівах суспензії з зерна після п'ятої-одинадцятої (на 30-90-ту добу) ріст був відсутній.

Наявність мікроорганізмів у зерні пшениці, яке було стерильним до пересадки в нього жуків, свідчить про те, що комахи, зокрема рисові довгоносики, відіграють роль механічного та, ймовірно, біологічного переносника збудника.

Порівнюючи результати двох серій експерименту, з'ясували, що тривалість виділення жуками в зовнішнє середовище патогенного штаму мікобактерій менше на 33,3% порівняно з тривалістю виділення дисоціативних форм *M. bovis*, що, ймовірно, може бути зумовлене нижчою кількістю КУО у вихідній культурі патогенного штаму порівняно з дисоціативним.

3.3.3. ПЛР-дослідження виділених культур

Молекулярно-генетична ідентифікація та генотипування. Вихідна культура за допомогою ПЛР була ідентифікована з праймерами для

M. tuberculosis complex, які ідентифікують *M. tuberculosis* та *M. bovis*. Потім було встановлено, що культура містить специфічне ДНК *M. bovis*. Наступні дослідні культури на кожному етапі дослідження також проходили молекулярно-генетичну ідентифікацію із підтвердженням видової приналежності (рис. 3.21).

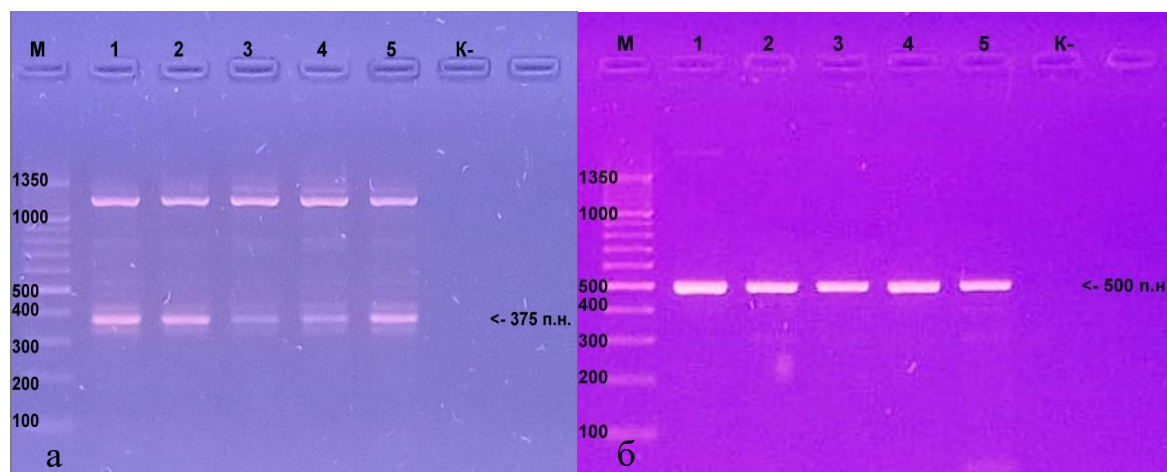


Рисунок 3.21. Результати ПЛР дослідження дослідних культур на 4, 8, 12, 20 та 30 добу досліду відповідно проби 1, 2, 3, 4, 5; М- маркер молекулярної маси, К- негативний контроль (деіонізована вода): а) ідентифікація цільового фрагменту ДНК для *M. tuberculosis complex* довжиною 375 п.н.; б) ідентифікація цільового фрагменту ДНК для *M. bovis* довжиною 500 п.н

Культура вихідного штаму та культура, отримана з гомогенізованих жуків на 30 добу досліду була генотипована за допомогою VNTR-методу (Рис. 3.22).

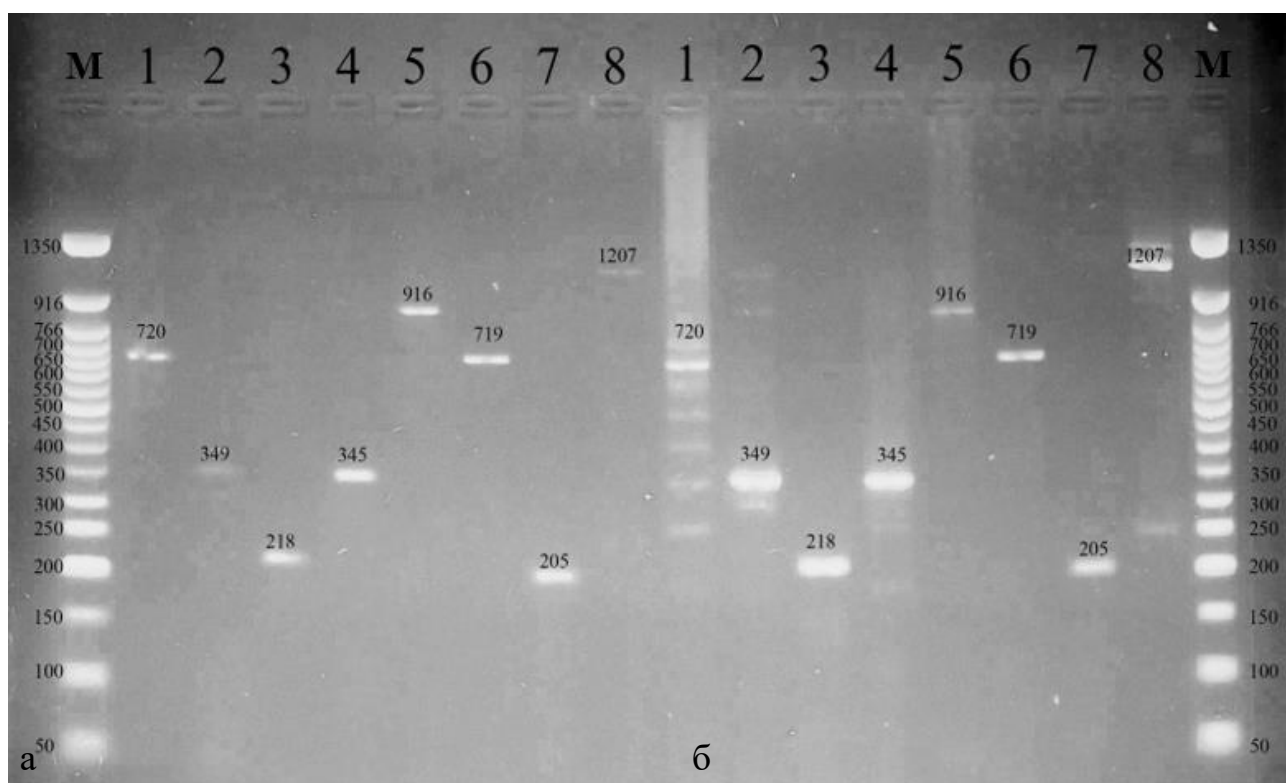


Рисунок 3.22.— Результати VNTR генотипування вихідного штаму *M. bovis* (а) та культури *M. bovis*, отриманої з гомогенізованих жуків на 30 добу досліду (б). М – маркер молекулярної маси, 1-8 амплікон отриманий за ПЛР із праймерами націленими на VNTR-локуси ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E, QUB-11a, QUB -11b, QUB-3232 відповідно.

Аналіз довжини фрагментів ампліконів отриманих в результаті ПЛР із праймерами направленими на цільові VNTR-локуси показав, що обидва штами були ідентичними штамами *M. bovis*. Під час пасажування мікобактерій в організмі комах в геномі мікроорганізмів не відбувалися зміни, які можна було б ідентифікувати методом VNTR-генотипування, а саме не відбулося змін у кількості тандемних повторів у варіабельних локусах, які були досліджені.

За результатами дослідження встановлено VNTR-профіль штаму *M. bovis*, який використовувався у дослідженні (табл. 3.5).

Таблиця 3.5 – Аналіз VNTR-профіль штаму *M.bovis*, який використовувався у дослідженні.

Характеристика продукту ПЛР	Назва локуса VNTR							
	ETR	ETR	ETR	ETR	ETR	QUB	QUB	QUB
	-A	-B	-C	-D	-E	-11a	-11b	-
Розмір повтору, п.н.	75	57	58	77	53	69	69	56
Розмір фрагменту, п.н.	195	121	44	114	492	167	67	423
Продукт реакції на форезі, п.н.	720	349	218	345	916	719	205	1207
Кількість повторів, шт	7	4	3	3	8	8	2	14

Відомості про генотип штаму були внесені до міжнародної бази MIRU-VNTRplus: Identification by Similarity Search (<https://www.miru-vntrplus.org/>). За допомогою онлайн-інструментів бази MIRU-VNTRplus було проаналізовано генетичний профіль дослідженого штаму і встановлено його спорідненість із іншими штамами *M. bovis* зареєстрованими у базі генетичних профілів (рис. 3.23).

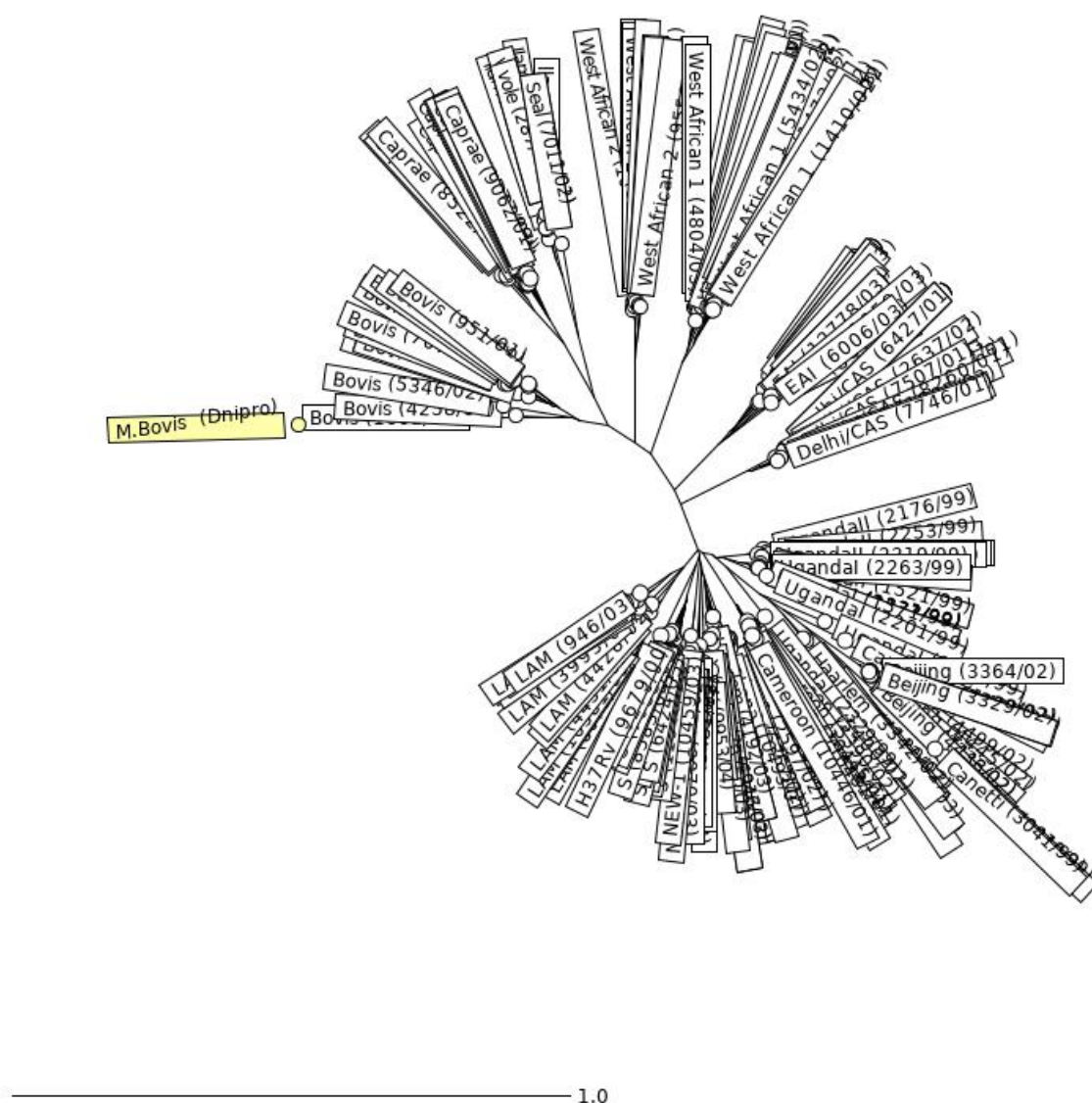


Рисунок 3.23. Радіальна дендрограма на основі VNTR-аналізу щодо спорідненості досліджуваного штаму *M. bovis* із штамами зареєстрованими в базі MIRU-VNTRplus.

3.4. Визначення впливу рисового довгоносика на біологічні властивості мікобактерій

Вплив комах на морфологію та біологічні властивості мікобактерій визначали в культурах та в мазках, що вдалося отримати в динаміці досліду з інфікуванням жуків. Культуральні властивості, ферментативна активність та життєздатність дисоціантів першої серії експерименту визначали в культурах, отриманих з гомогенізату рисових довгоносиків на 30-ту добу досліду та з

суспензії з зерна на 4-ту; 8-му; 12-ту; 20-ту та 30-ту добу досліду. Під час мікроскопії вищенаведених культур та мазків отриманих зі змивів та гомогенізату жуків у динаміці експерименту, визначали морфологію та тинкторіальні властивості мікобактерій.

У другій серії досліду визначали морфологічні ознаки, культуральні властивості, ферментативну активність та життєздатність *M. bovis* в культурах, що були отримані з гомогенізату жуків на 30-ту добу експерименту та з суспензії з зерна пшениці на 4-ту, 8-у, 12-ту та 20-ту добу.

Отримані показники порівнювали з ознаками вихідних субкультур, які були використані для контамінації зерна і, відповідно, після інфікування довгоносиків.

3.4.1. Визначення морфології, тинкторіальних, культуральних властивостей мікобактерій виділених з організму жуків та контамінованого ними зерна

Оцінюючи культуральні властивості культур, отриманих у I серії експерименту встановили, що для всіх дослідних зразків ознаки були подібними. Оптимальною температурою інкубування культур виявилось $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, появу первинного росту реєстрували на 12-ту добу з гомогенізату на 30-ту добу дослідження та з суспензії з зерна після однієї пересадки (4-та доба експерименту), що в 4 рази триваліше від вихідної культури; на 16-ту добу з суспензії з зерна після другої та третьої (8-ма та 12-та доба дослідження) пересадок жуків, що в 5,3 рази більш тривало від вихідної культури, на 18-ту добу після четвертої (20-та доба) пересадки, що в 6 разів триваліше, на 40-у добу після п'ятої пересадки (30-та доба) довгоносиків у стерильне зерно, що, в свою чергу, в 13,3 рази довше, порівняно з вихідним штамом 118-го пасажу дисоціативних форм *M. bovis* (рис. 3.24).

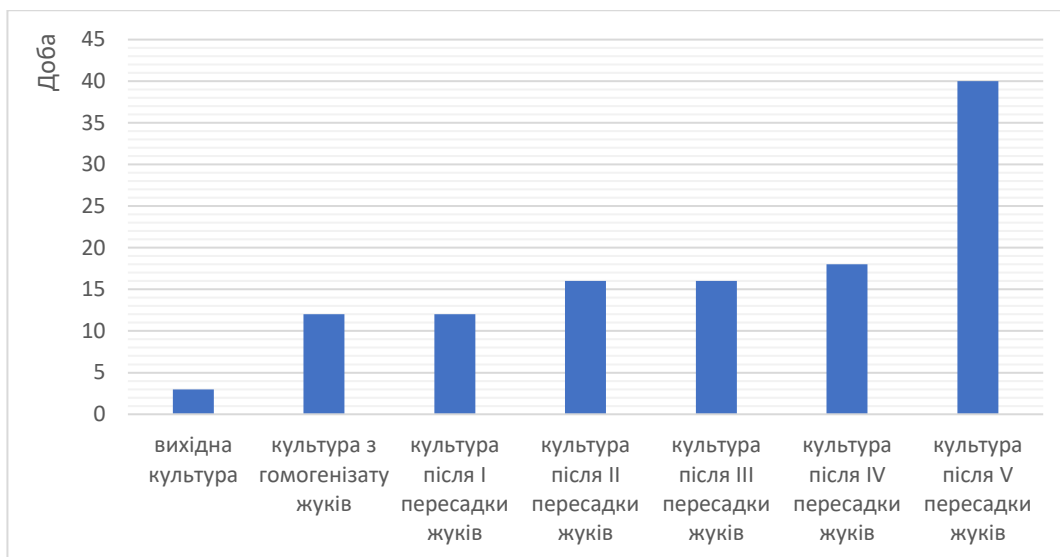


Рис. 3.24 Час появи первинного росту культур виділених після пасажування через організм рисового довгоносика

Відмічали суцільний ріст при посіві суспензії з зерна після однієї пересадки (на 4-ту добу експерименту) та окремі колонії по лінії посіву в усіх інших дослідних зразках. Інтенсивність росту була помірною, окрім пробірок, що засіяні суспензією з зерна на 4-ту добу експерименту, де ріст був пишним. Колонії чисельні, дрібні, окрім культур, що виділені з гомогенізату жуків на 30-ту добу експерименту, у яких спостерігали поодинокі середні за розміром колонії. Порівнюючи з вихідною культурою, можна стверджувати, що зменшення інтенсивності росту збудника після пасажування через організм довгоносика, розмір та чисельність колоній відрізняються лише в культурах виділених з гомогенізату жуків, в інших зразках різниця з вихідним штамом відсутня. Усі дослідні зразки мали правильну форму колоній (S-форма), здатні до утворення пігменту, володіли в'язкою консистенцією, наявністю блиску, задовільною емульгованістю у фізіологічному розчині, здатністю до росту на простих живильних середовищах (додаток Г). Усі вищеназвані ознаки є ідентичними до вихідної культури.

Отже, основними відмінностями від вихідного штаму є збільшення терміну появи росту та зниження інтенсивності росту колоній.

Аналізуючи культуральні властивості отриманих у II серії досліду культур, можна стверджувати, що значних змін після проходження через організм рисового довгоносика мікобактерії не зазнали. Оптимальна температура культивування — $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, однак тривалість появи первинного росту збільшилась до 1,2-1,7 разів в динаміці експерименту порівняно з вихідним штамом, окрім культури отриманої після однієї пересадки жуків, де прояв росту спостерігався на 14-ту добу, що є аналогічним до вихідної (рис. 3.25).

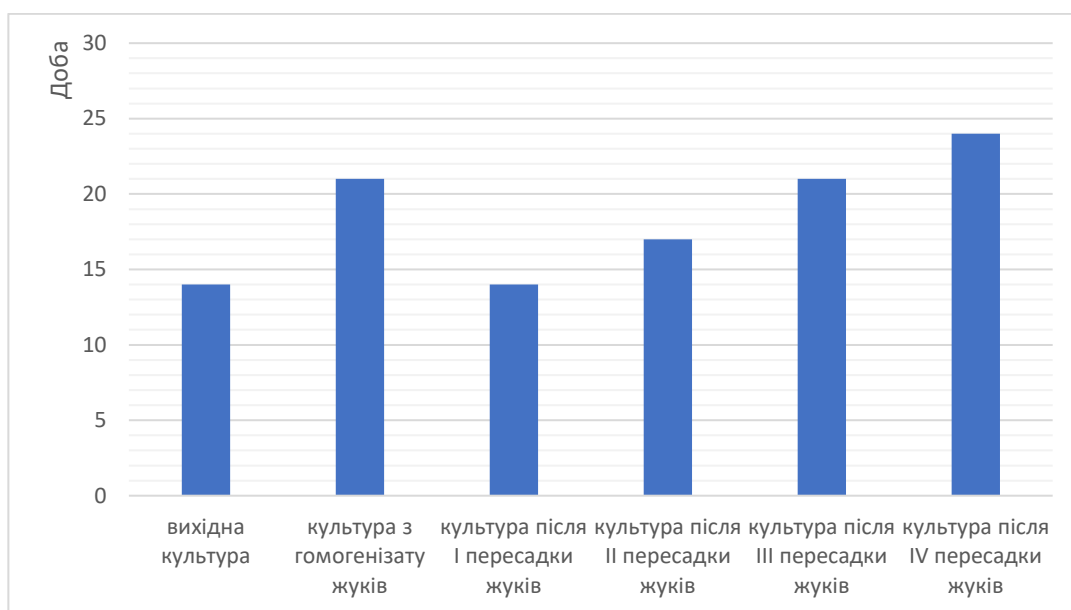


Рис. 3.25. Час появи первинного росту культур виділених після пасажування через організм рисового довгоносика

Усі культури мали вигляд окремих колоній помірної інтенсивності росту, окрім культури отриманої після четвертої пересадки жуків, де ріст був слабким.

Колонії всіх культур були дрібними, неправильної форми з шорсткою поверхнею (R-форма), кількість їх була чисельною в усіх зразках, крім культури отриманої з суспензії зерна після третьої та четвертої пересадки довгоносиків, де колонії були поодинокими. Усі зразки були здатні до пігментоутворення (колір слонової кістки), консистенція колоній крихка, поверхня матова. Культури не здатні до емульгації у фізіологічному розчині, не ростуть на простих живильних середовищах (МПА, МПБ) (додаток д).

При оцінці морфологічних ознак і тинкторіальних властивостей методом світлової мікроскопії визначили, що всі дослідні зразки першої серії експерименту не відрізнялись між собою. Мікобактерії були представлені кислотостійкими зернами, що розташовувались скупченнями та поодинокі. Мікробні клітини володіли слабо вираженою зернистістю, неоднорідною оптичною щільністю поверхні, L-форми та елементарні тільця не виявлені.

Оцінюючи морфологію та тинкторіальні властивості культур другої серії дослідження також були ідентичними між собою. Мікобактерії мали вигляд кислотостійких прямих коротеньких паличок із заокругленими кінцями. У мазку мікобактерії розташовувались скупченнями та поодинокі, зернистість була виражена, відмічалась неоднорідна оптична щільність поверхні мікробної клітини. Елементарні тільця та L-форми були відсутні.

У цілому, порівнюючи отримані дані з ознаками вихідної культури мікобактерій, ми можемо стверджувати, що рисові довгоносики не призводять до зміни морфології вірулентного штаму та дисоціативних форм *M. bovis*.

3.4.2. Ферментативна активність мікобактерій отриманих після пасажування через організм рисового довгоносика

У виділених культурах у першій та другій серії експерименту, що описані в підрозділі 3.4. провели дослідження ферментативної активності: каталазної, пероксидазної, дегідрогеназної, нітратредуктазної та оцінили здатність до гідролізу ТВІН-80.

У першій серії дослідів нами встановлено, що пасажування дисоціативних форм *M. bovis* через організм рисового довгоносика призвело до підвищення активності наступних ферментів: дегідрогеназа та нітратредуктаза (таблиця 3.6).

Таблиця 3.6 – Біохімічна активність дисоціативної форми *M. bovis* (пасаж №118) в динаміці дослідів (n=3)

Дослідна культура	Каталазна активність		Пероксидазна активність	Дегідрогеназна активність		Нітратредуктазна активність	Гідроліз ТВІН-80		
	15хв	30хв	2год	30хв	24 год		4год	5діб	10 діб
Доба дослідження									
Культура, отримана з зерна на 4 добу досліду	++	++	-	-	-	±	-	-	+
на 8 добу	++	++	-	-	±	+	-	-	+
на 12 добу	++	++	-	-	±	+	-	-	+
на 20 добу	++	++	-	-	±	+	-	-	+
на 30 добу	++	++	-	-	±	+	-	-	+
Культура, отримана з гомогенізованих жуків на 30 добу досліду	++	++	-	-	±	+	-	-	+

Примітка: + - позитивна реакція; - -негативна реакція; ± - сумнівна реакція; для каталазної активності (визначення інтенсивності утворення пухирців): +++ - рясне; ++ - помірне; + - поодинокі; - - відсутні.

Всі досліджувані культури володіли помірною активністю каталази (рис. 3.26).

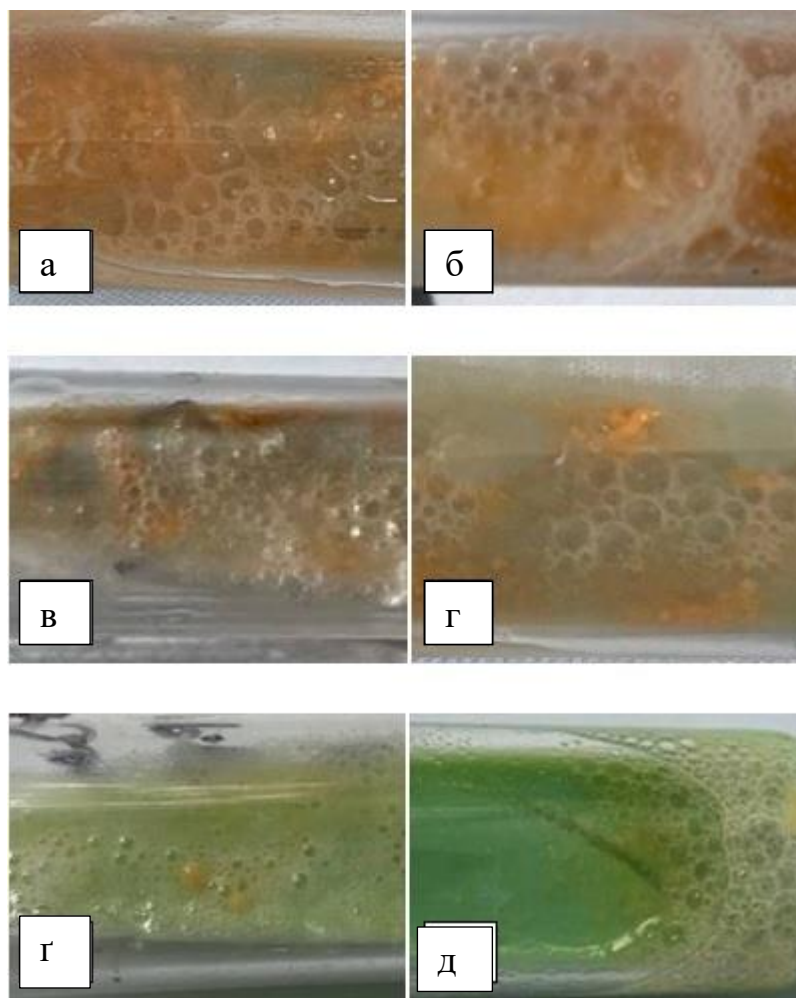


Рис. 3.26. Облік каталазної активності дослідних культур: А – культура отримана з зерна на 4 добу, Б – на 8 добу, В – на 12 добу, Г – на 20 добу, Ґ - на 30 добу, Д - з гомогенізату жуків на 30 добу.

Пероксидазна активність виявилась негативною в усіх дослідних зразках. Досліджуючи активність дегідрогенази не виявили знебарвлення розчину метиленового синього в жодній з культур через 15-30 хвилин. Негативною також виявилась реакція в культурі отриманій з суспензії з зерна на 4-ту добу експерименту через 24 години. Однак спостерігали часткове знебарвлення розчину метиленової синьки через 24 год у всіх інших культурах (рис. 3.27).

Досліджуючи активність редукції нітратів встановили, що результат виявився сумнівним у культурі з зерна після однієї пересадки, що збігається з результатом у вихідній культурі, всі інші дослідні культури набували здатність редукувати нітрати (утворення жовтого забарвлення), однак більш виражена

активність помітна в культурах отриманих з зерна на 8-му добу експерименту та з гомогенізату жуків на 30-ту добу (рис. 3.27).

Результат гідролізу ТВІН-80 в усіх дослідних зразках виявився негативним через 4 год та 5 діб. Однак на 10-ту добу спостережень виявили позитивний результат (утворення рожево-червоного забарвлення) в усіх досліджуваних культурах (рис. 3.27).

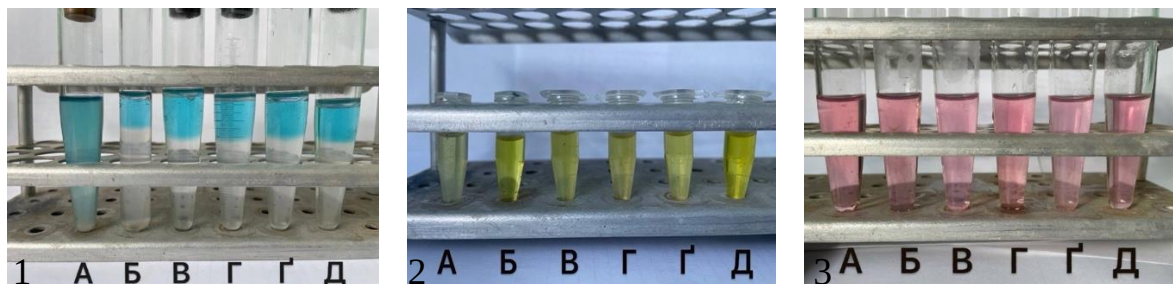


Рис. 3.27. 1. Облік дегідрогеназної активності дослідних культур; 2. нітратредуктазної активності; 3. реакція гідролізу ТВІН-80: А – культура отримана з зерна на 4 добу Б – на 8 добу, В – на 12 добу, Г – на 20 добу, Г - на 30 добу, Д - з гомогенізату жуків на 30 добу.

Аналізуючи отримані дані, спостерігаємо, що культура отримана з зерна на 4-ту добу експерименту не відрізняється за ферментативною активністю від вихідного штаму, що свідчить про відсутність безпосереднього впливу на властивості збудника на даному етапі досліджу.

Друга серія дослідження продемонструвала, що геном вірулентних мікобактерій є більш стійкий, однак певні коливання біохімічних властивостей спостерігались. Після проходження збудника через організм рисового довгоносика в деяких дослідних культурах відмічалось підвищення дегідрогеназної та нітратредуктазної активності, отримані дані висвітлені в таблиці 3.7.

Таблиця 3.7 – Біохімічна активність дисоціативної форми *M. bovis* (пасаж №100) в динаміці досліду (n=3)

Дослідна культура	Каталазна активність		Пероксидазна активність	Дегідрогеназна активність		Нітратредуктазна активність	Гідроліз ТВІН-80		
	15хв	30хв	2год	30хв	24 год		4год	5діб	10 діб
Культура, отримана з зерна на 4 добу досліду	-	-	-	-	-	-	-	-	-
на 8 добу	-	-	-	-	-	-	-	-	-
на 12 добу	-	-	-	-	-	±	-	-	-
на 20 добу	-	-	-	-	±	±	-	-	-
Культура, отримана з гомогенізованих жуків на 30 добу досліду	-	-	-	-	±	±	-	-	-

Примітка: (+) - позитивна реакція; (-) - негативна реакція; (±) - сумнівна реакція.

Каталазна та пероксидазна активність не спостерігалася в жодній із дослідних культур. Усі культури не проявляли дегідрогеназну активність в перші 15-30 хв після проведення реакції, але спостерігалось часткове знебарвлення розчину метиленового синього через 24 год в культурах, отриманих з гомогенізату жуків на 30-ту добу та суспензії з зерна на 20-ту добу досліду.

Визначаючи нітратредуктазну активність, негативну реакцію виявили в культурах отриманих із суспензії з зерна на 4-ту та 8-у добу дослідження, тоді як

в культурах із суспензії з зерна на 12-ту та 20-ту та з гомогенізату довгоносиків на 30-ту добу реакція була сумнівною, в пробірках виявляли слабе забарвлення розчину в жовтий колір.

Досліджуючи здатність до гідролізу ТВІН-80 встановили, що всі культури не проявляли ферментативну активність.

Проаналізувавши отримані результати визначили, що підвищення ферментативної активності вірулентного штаму спостерігається після тривалого перебування збудника в організмі рисового довгоносика, що, вірогідно, свідчить про активізацію механізмів захисту бактеріальної клітини та її пристосування в умовах макроорганізму.

З огляду на отримані дані, що наведені в таблицях 3.1; 3.6 та 3.7, можна стверджувати, що біохімічна активність є пластичною, зокрема результати наших досліджень демонструють, що проходження дисоціативних форм 118-го пасажу та патогенного штаму *M. bovis* через організм рисового довгоносика призводить до певних змін біохімічних властивостей бактеріальної клітини. Зокрема, отримані дані дозволяють припускати, що мінливість біохімічних показників дисоціантів відбувається як наслідок посилення систем виживання та адаптації мікроба до нових умов оточуючого середовища.

3.4.3. Визначення життєздатності мікобактерій виділених після пасажування через організм рисового довгоносика

На даному етапі дослідження визначали життєздатність культур, які отримали після пасажування вихідного штаму через організм рисового довгоносика, описані в підрозділах 3.3 та 3.4. У першій серії дослідження обчислення КУО проводили за восьмого розведення для культур отриманих із суспензії зерна на 4-ту та 8-му добу експерименту, за сьомого розведення – культури отримані з суспензії зерна на 12-ту добу та гомогенізату з інфікованих довгоносиків на 30-ту добу; за шостого розведення – культури з суспензії зерна на 20-ту та 30-ту добу.

Визначили, що кількість колоній, які вирости з культури отриманої на четверту добу досліду з суспензії зерна - $321,0 \pm 9,9$; на восьму добу – $293,0 \pm 15,6$ колоній в $6,4 \times 10^{-5}$ мг мікробної маси, тобто в 1 г культури $501562500,0 \approx 5,0 \times 10^8$ та $457812500,0 \approx 4,6 \times 10^8$ життєздатних мікроорганізмів відповідно.

Обчислюючи кількість життєздатних мікобактерій у культурі отриманій із суспензії зерна на 12-ту добу досліду та культурі з гомогенізату жуків на 30-ту добу визначили, що кількість колоній дорівнювала $350,0 \pm 43,8$ та $442,0 \pm 32,5$ в $3,2 \times 10^{-4}$ мг бактеріальної маси відповідно. Тобто, $109375000,0 \approx 1,1 \times 10^8$ та $138125000,0 \approx 1,4 \times 10^8$ бактерій в 1 г культури.

Визначаючи кількість КУО культур, отриманих із суспензії зерна на 20-ту та 30-ту добу, встановили, що $1,6 \times 10^{-3}$ мг мікробної маси містить $237,0 \pm 39,6$ та $209,0 \pm 24,0$ мікробних одиниць відповідно, тобто $148125000,0 \approx 1,5 \times 10^7$ та $13062500,0 \approx 1,3 \times 10^7$ мікробних одиниць в 1 г культури (таблиця 3.8).

Таблиця 3.8 – Оцінка колонієутворюючих одиниць дисоціативної форми *Mycobacterium bovis* (118 пасаж) в динаміці досліду

		Кількість вирослих колоній на живильному середовищі										M±m	Кількість КУО в 1г бактеріальної маси
		Кратність розведення											
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
Культура, отримана з зерна на 4 добу дослідів	зразок №1	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	314	р.в.	р.в.	321,0±9,9	5,0*10 ⁸
	зразок №2	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	328	р.в.	р.в.		
Культура, отримана з зерна на 8 добу дослідів	зразок №1	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	282	р.в.	р.в.	293,0±15,6	4,6*10 ⁸
	зразок №2	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	304	р.в.	р.в.		
Культура, отримана з зерна на 12 добу дослідів	зразок №1	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	319	р.в.	р.в.	р.в.	350,0±43,8	1,1*10 ⁸
	зразок №2	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	381	р.в.	р.в.	р.в.		
Культура, отримана з	зразок №1	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	209	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	237,0±39,6	1,5*10 ⁷

зерна на 20 добу дослід	зразок №2	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	265	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.		
Культура, отримана з зерна на 30 добу дослід	зразок №1	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	192	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	209,0±24,0	1,3*10 ⁷
	зразок №2	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	226	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.		
Культура, отримана з гомогенізованих жуків на 30 добу дослід	зразок №1	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	419	р.в.	р.в.	р.в.	442,0±32,5	1,4*10 ⁸
	зразок №2	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	465	р.в.	р.в.	р.в.		

Примітки: с.р. – суцільний ріст колоній на живильному середовищі; р.в. – ріст відсутній.

У другій серії експерименту визначення кількості КУО проводили за 5-го розведення в культурах виділених із суспензії з зерна на 4-ту та 8-у добу експерименту й з гомогенізату рисових довгонощиків на 30-ту добу. За четвертого розведення – культури отримані з суспензії з зерна на 12-ту добу, за третього – на 20-ту добу дослід.

Визначили, що кількість КУО в культурі з зерна на 4-ту добу дорівнювала $214,0 \pm 11,3$; на 8-у добу – $196,0 \pm 8,5$; з гомогенізату жуків – $88,0 \pm 11,3$ колоній в $8,0 \times 10^{-2}$ мг культури, тобто в 1 г $2675000,0 \approx 2,7 \times 10^6$; $2450000,0 \approx 2,5 \times 10^6$; $1100000,0 \approx 1,1 \times 10^6$ відповідно.

Кількість КУО культури з суспензії зерна на 12-ту добу становила $182,0 \pm 22,6$ колоній в 0,4 мг, відповідно $455000,0 \approx 4,6 \times 10^5$ життєздатних мікобактерій в 1 г культури.

Кількість вирослих колоній в культурі з суспензії з зерна на 20-ту добу експерименту становила $226,0 \pm 19,8$ в 2 мг, тобто в 1 г – $113000,0 \approx 1,1 \times 10^5$ колонієутворюючих одиниць (табл. 3.9)

Таблиця 3.9 – Оцінка колонієутворюючих одиниць вірулентного штаму
Mycobacterium bovis в динаміці досліджу

		Кількість вирослих колоній на живильному середовищі										M±m	Кількість КУО в 1г бактеріаль- ної маси
		Кратність розведення											
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
Культура, отримана з зерна на 4 добу досліджу	зразок №1	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	206	р.в.	р.в.	с.р.	р.в.	р.в.	214,0±11,3	2,7*10 ⁶
	зразок №2	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	222	р.в.	р.в.	с.р.	р.в.	р.в.		
Культура, отримана з зерна на 8 добу досліджу	зразок №1	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	190	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	196,0±8,5	2,5*10 ⁶
	зразок №2	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	202	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.		
Культура, отримана з зерна на 12 добу досліджу	зразок №1	с.р.	с.р.	с.р.	166	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	182,0±22,6	4,6*10 ⁵
	зразок №2	с.р.	с.р.	с.р.	198	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.		
Культура, отримана з зерна на 20 добу досліджу	зразок №1	с.р.	с.р.	212	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	226,0±19,8	1,1*10 ⁵
	зразок №2	с.р.	с.р.	240	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.		
Культура, отримана з гомогенізованих жуків на 30 добу досліджу	зразок №1	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	80	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	88,0±11,3	1,1*10 ⁶
	зразок №2	с.р.	с.р.	с.р.	с.р.	96	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.	р.в.		

Примітки: с.р. – суцільний ріст колоній на живильному середовищі; р.в. – ріст відсутній.

Проаналізувавши отримані дані з першою серією ми можемо стверджувати, що жуки, зокрема рисові довгоносики, здатні резервувати та виділяти життєздатні мікобактерії контамінуючи об'єкти зовнішнього середовища. Водночас, якщо порівнювати показники отримані в першій серії експерименту з показниками вихідного штаму дисоціантів описаними в таблиці 3.2, спостерігаємо тенденцію до зниження життєздатності виділеного довгоносами збудника впродовж дослідження. Кількість колонієутворюючих

одиниць в культурах виділених із зерна на 4-ту добу досліді знизилась на 5,03% порівняно з вихідним штамом, 8-му добу – на 13,32%, 12-ту добу – на 79,29%, 20-ту добу – на 97,20%, 30-ту добу – 97,53% відповідно. Життєздатність 118-го пасажу *M. bovis* в організмі жуків на 30-ту добу (в гомогенізаті) знизилась на 73,85% від вихідної культури.

Що стосується другої серії експерименту, спостерігаємо подібні результати, кількість життєздатних патогенних мікобактерій знижувалась в динаміці досліді. Порівняно з показниками вихідного штаму кількість КУО в культурі виділень із суспензії зерна на 4-ту добу експерименту знизилась на 9,3%; на 8-му добу – на 16,9%; 12-ту добу – на 84,6%; 20-ту добу – на 96,2%; в культурі виділень із гомогенізату рисового довгоносика на 30-ту добу – на 62,8%.

3.5. Визначення ступеня вірулентності мікобактерій вихідного патогенного та дисоціативного штамів і культур отриманих після пасажування через організм жуків

Мурчаків утримували за температури $15,0-18,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, яка була встановлена нами як оптимальна для фізіологічного набору маси тіла тварин у дослідному віці (Alifonova & Zazharskyi, 2021).

Під час двотижневого карантину мурчаки піддавались туберкулінізації для виключення спонтанного (природнього) туберкульозу. Всі дослідні тварини продемонстрували негативний результат алергічної проби і були допущені до інфікування.

3.5.1. Дослідження вірулентності материнського штаму та дисоціативних форм *M. bovis* у динаміці досліді на жуках

Для встановлення впливу рисового довгоносика на зміну вірулентності дисоціативної форми *M. bovis* було використано вихідну культуру 118-го пасажу (240 генерація), культури, що виділені з суспензії зерна на 4-ту, 8-му, 12-ту, 20-ту та 30-ту добу, на якому утримувались інфіковані жуки, а також культуру

отриману з гомогенізату довгоносиків на 30-ту добу досліду (всі культури інкубувались за температури $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Відповідно, було сформовано 7 дослідних груп та одну контрольну (по 3 тварини в кожній групі). Тварин I групи інфікували вихідним штамом мікобактерій, який не піддавався впливу організму жуків; II – культурою, отриманою з зерна на 4-ту добу досліду, III – на 8-му, IV – на 12-ту, V – на 20-ту, VI – 30-ту, VII – культурою, отриманою з гомогенізату жуків на 30-ту добу досліду. Контрольна група (VIII) залишалась інтактною протягом всього періоду дослідження.

Введення завису дослідних мікобактерій мурчакам не викликало клінічних та патологоанатомічних ознак характерних для перебігу туберкульозу в жодній з дослідних груп, виразка в місці введення завису не формувалась.

Упродовж експерименту тварини були активними та набирали вагу (рис. 3.28). При вивченні результатів сенсibiliзації дослідних культур встановлено, що мурчаки всіх експериментальних груп не реагують на введення ППД-туберкуліну, гіперемія, припухання та виразки в місці інюкуляції відсутні.

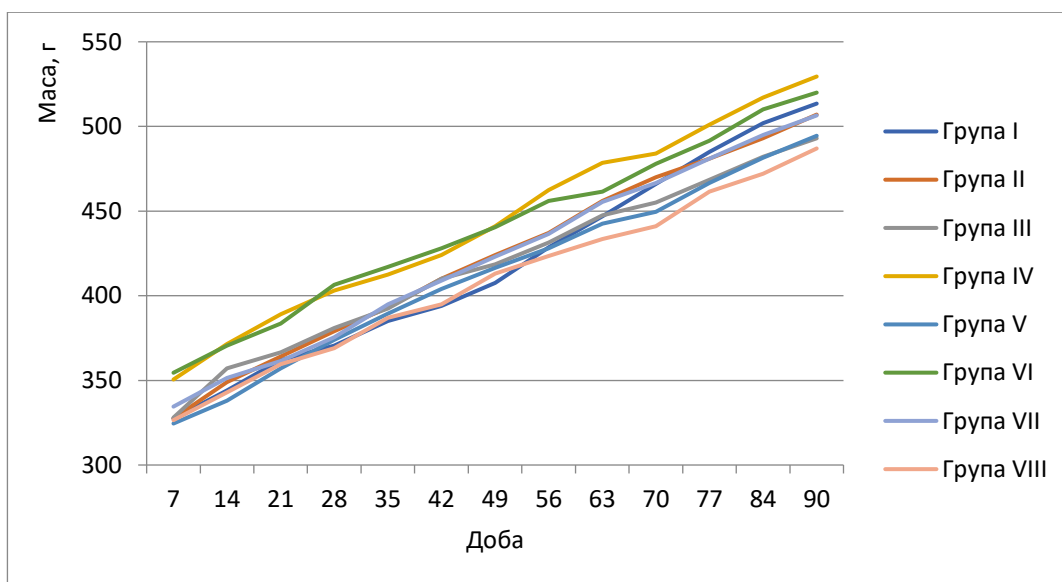


Рис. 3.28. Динаміка зміни маси тіла дослідних мурчаків впродовж експерименту

Протягом 90 дослідних діб тварини не загинули самостійно, тому були евтанізовані та піддавались патологоанатомічному дослідженню. У внутрішніх

органах (легені, печінка, селезінка) та лімфатичних вузлах не виявлено зміни, які характерні для туберкульозу. Індекс ураження організму дослідних мурчаків усіх груп за схемою М.С. Триуса – 0 балів. Відновлення вірулентності дисоціативних форм мікобактерій після проходження через організм довгоносіка не відмічається.

З органів від кожного мурчака окремо було виготовлено мазки-відбитки з наступним забарвленням їх за методом Ціля-Нільсена та переглядом під імерсійною системою мікроскопа. Встановлено, що в першій та другій дослідних групах дисоціативні форми виявлено в легенях і печінці 3-х свинок (100%), в селезінці однієї свинки (33,3%), в лімфатичних вузлах мікобактерії не виявлено. У третій групі: в легенях і печінці 3-х свинок (100%), в селезінці та лімфовузлах збудник не виявлено. У четвертій та п'ятій групах у легенях 3-х свинок (100%), печінці 2-х свинок (66,7%), в селезінці та лімфатичних вузлах – збудник відсутній. У шостій – в легенях 3-х свинок (100%), в печінці та селезінці однієї свинки (33,3%), у лімфовузлах збудник не виявлено. У тварин із сьомої групи – в легенях 2-х свинок (66,7%), в печінці однієї свинки (33,3%), в селезінці та лімфатичних вузлах мікобактерії не виявлено (табл. 3.10). При мікроскопії мазків мурчаків із контрольної групи, дослідні мікобактерії не виявлено в органах та лімфатичних вузлах (рис. 3.29).

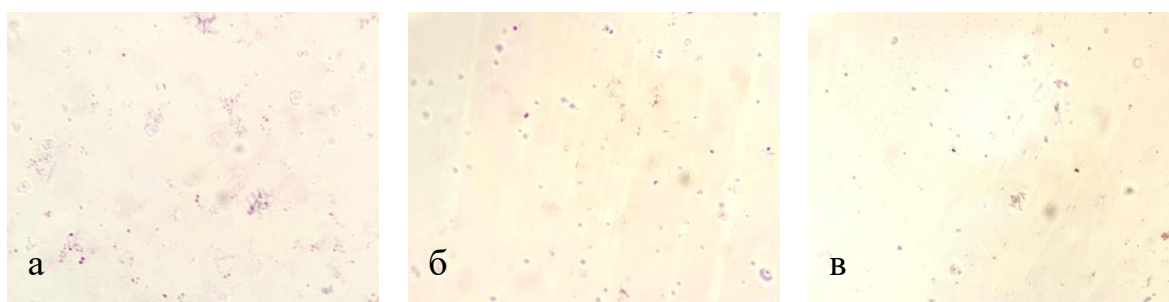


Рис. 3.29. Мазки відбитки з органів дослідних мурчаків: а – легені; б – печінка; в – селезінка
(забарвлення за Цілем-Нільсеном, х1600)

Таблиця 3.10 – Відсоток виявлення дослідних мікобактерій у мазках-відбитках із внутрішніх органів лабораторних тварин (n=3)

	Легені	Печінка	Селезінка	Лімфатичні вузли
I група	100%	100%	33,30%	0%
II група	100%	100%	33,30%	0%
III група	100%	100%	0%	0%
IV група	100%	66,70%	0%	0%
V група	100%	66,70%	0%	0%
VI група	100%	33,30%	33,3%	0%
VII група	66,7%	33,30%	0%	0%
Контрольна група	0%	0%	0%	0%

Разом із цим при посіві суспензії з органів та лімфатичних вузлів на живильне середовище Мордовського («Нове») спостерігали ріст гладеньких округлих з рівними краями світло-помаранчевих колоній ідентичних за морфологічними ознаками до дисоціативних форм *M. bovis* (118-й пасаж) на 8-10 добу з органів морських свинок інфікованих вихідною культурою та культурами отриманими з суспензії зерна на 4-ту, 8-у та 12-ту добу й з гомогенізату жуків на 30-ту добу досліду. Та на 12-ту добу ріст з органів морських свинок інфікованих суспензією з зерна на 20-ту й 30-ту добу досліду. Водночас в пробірках із контрольної групи тварин росту не виявлено.

Тобто всупереч відсутності характерних патологоанатомічних змін та сенсibilізації у лабораторних тварин, ми можемо стверджувати про персистенцію мікобактерій в організмі мурчаків.

Аналізуючи виявлення дослідного штаму збудника в мазках-відбитках із внутрішніх органів та появи росту культур на живильному середовищі можемо стверджувати, що вихідна культура й культури, які отримані після пасажування через організм рисового довгоносика здатні призводити до виникнення доброякісного інфекційного процесу. Також спостерігаємо закономірне зниження відсотка виявлення мікобактерій у часі експерименту в органах

мурчаків й підвищення тривалості появи первинного росту культури, тобто вихідна культура та культура, яка виділена на початку експерименту на жуках сприяють більш активному розвитку інфекційного процесу в мурчаків.

Водночас порівнюючи дані таблиці 3.2 та 3.8 – спостерігаємо чітку залежність між зниженням кількості життєздатних мікобактерій та зниженням активності виникнення інфекційного процесу й прояву росту посівів. Отримані дані свідчать про те, що пасажування дисоціативних форм *M. bovis* через організм жуків не змінює вірулентність збудника, патогенні властивості не відновлюються, однак здатність призводити до появи інфекційного процесу зберігається, враховуючи виявлення дослідних мікобактерій у мазках-відбитках внутрішніх органів експериментально інфікованих лабораторних тварин.

Досліджуючи вірулентність 100-го пасажу *M. bovis* в динаміці експерименту пасажування через рисового довгоносика було сформовано 6 дослідних груп та одну контрольну: I група – мурчаків інфікували зависом вихідної культури; II – культурою, отриманою з зерна на 4-ту добу досліду; III – на 8-му; IV – на 12-ту; V – на 20-ту; VI – культурою виділеною з гомогенізату довгоносиків на 30-ту добу. Контрольна група (VII) не піддавалася інфікуванню.

До 28-ї доби після зараження мурчаки всіх груп були активними та набирали вагу. Починаючи з 28-35-ї доби спостерігалось динамічне зниження маси тіла в дослідних групах, а в контрольній – тварини продовжували збільшувати вагу до кінця досліду (рис.3.30).

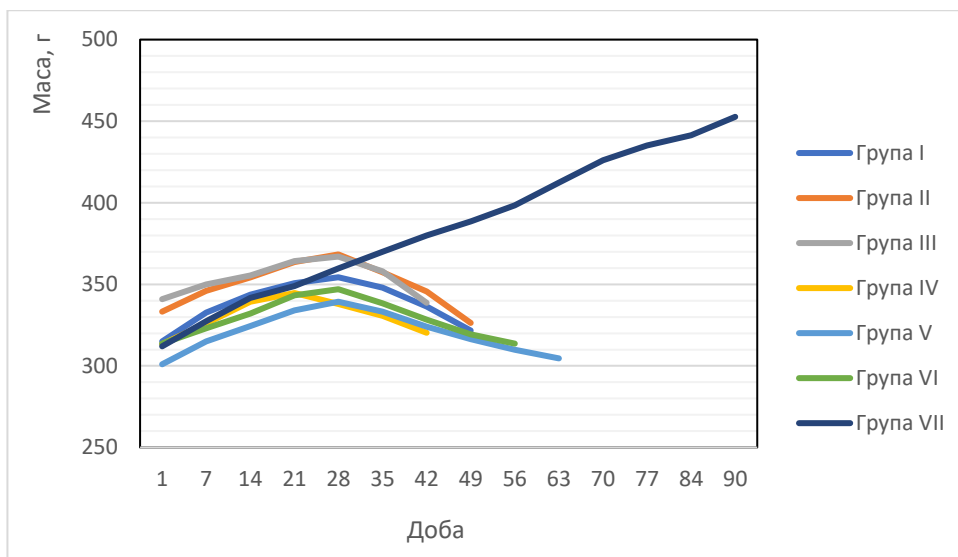


Рис. 3.30. Динаміка зміни маси тіла дослідних мурчаків впродовж експерименту

У мурчаків I, II та IV груп спостерігали формування виразки в місці введення завису на 20-ту добу після зараження, а в III, V, VI групах – на 27-му; прорив виразки відмічали через 8-11 діб (рис. 3.31). Також відмічали різке збільшення пахового лімфатичного вузла в ділянці інокуляції на 22-24-ту добу в тварин усіх груп.



Рис. 3.31. Виразка в місці інокуляції мікобактерій: а – формування; б – прорив

Введення ППД-туберкуліну для ссавців мурчакам усіх груп на 30-ту та тваринам п'ятої групи на 60-ту добу супроводжувалось виникненням алергічної реакції у вигляді гіперемії та припухання шкіри через 24 години після інокуляції

та утворенням виразки через 48 годин. Мурчаки контрольної групи не реагували на введення алергену (рис. 3.32).

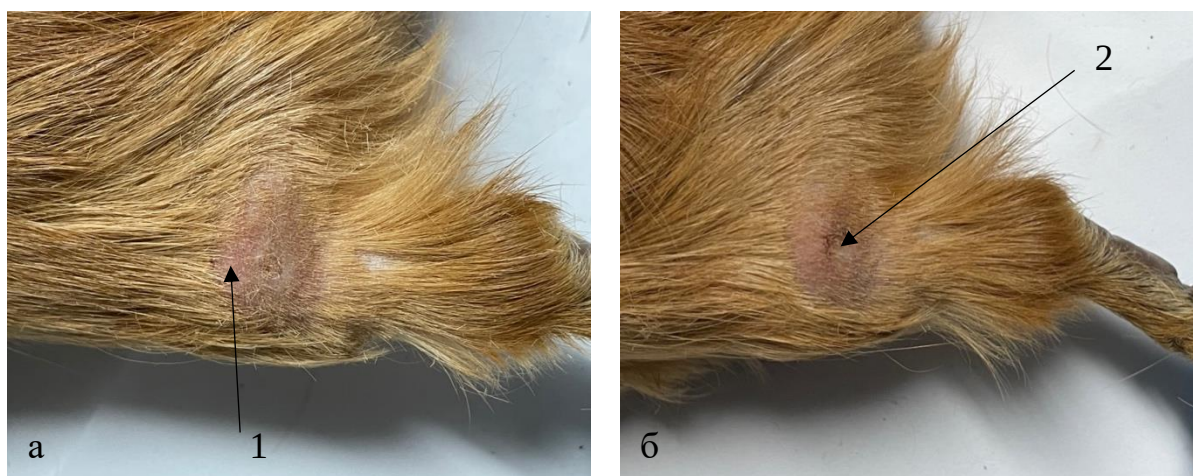


Рис. 3.32. Облік туберкулінізації після введення ППД-туберкуліну: а – через 24 год; б – через 48 год після інокуляції; 1- припухання шкіри; 2 – формування виразки.

Загибель свинок першої групи спостерігали через $52 \pm 3,0$ доби, другої – $54 \pm 1,0$; третьої – $47 \pm 2,0$; четвертої – $43 \pm 2,6$; п'ятої – $64 \pm 3,5$; шостої – $58 \pm 5,5$ доби. Морських свинок із контрольної групи було етанізовано на 90-ту добу експерименту.

Наступним етапом проводили розтин та патологоанатомічне дослідження загинилих та етанізованих морських свинок. Труп тварин I-VI груп були виснажені, спостерігали характерні для туберкульозу зміни в легенях, печінці та селезінці, в органах відмічали численні сірувато-жовті вузлики різного розміру з казеозним вмістом, печінка, селезінка та пахвинні лімфовузли були збільшеними за розміром, лімфатичні вузли мали дрібні осередки некрозу та містили гнійну масу всередині (рис. 3.33). У мурчаків контрольної групи жодних змін, що характерні для туберкульозу не виявлено.

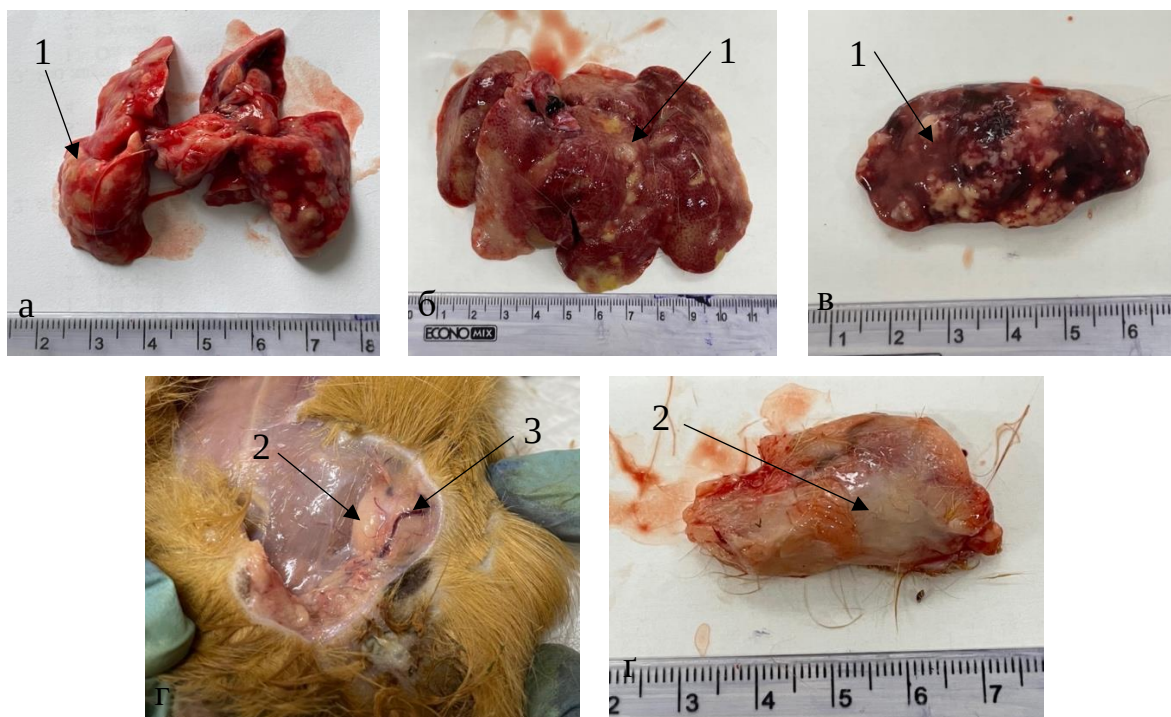


Рис. 3.33. Патологоанатомічні зміни дослідних тварин : а – легені; б – печінка; в – селезінка; г, д – лімфатичні вузли; 1 – туберкули з казеозним вмістом; 2 – збільшення лімфатичного вузла; 3 – гіперемія судин

За схемою М.С. Триуса обраховували індекс ураження організму мурчаків, характерні макроскопічні зміни оцінювали в плюсах із наступним переведенням у цифрові бали (табл. 3.11).

Таблиця 3.11 – Індекс ураження органів дослідних мурчаків за експериментального внутрішньошкірного інфікування зависом мікобактерій

№ групи	№ тварини	Специфічні ураження (наявність туберкул)				Індекс ураження
		Легені	Печінка	Селезінка	Лімфатичні вузли	
I	1	++	+++	+	-	19
	2	++	++	+	-	16
	3	++	+++	++	+	22
II	1	++	++	++	-	18
	2	+++	++	++	-	22
	3	++	+++	++	-	21

III	1	+++	+++	++	-	25
	2	++	+	+++	-	17
	3	+++	+++	+++	-	27
IV	1	+++	+++	+++	+	28
	2	+++	+++	+++	-	27
	3	+++	+++	+++	-	27
V	1	+	++	+	-	12
	2	+	-	++	-	8
	3	++	+	+	-	13
VI	1	++	+++	+	-	19
	2	++	+	+	-	13
	3	++	++	-	-	14
VII	1	-	-	-	-	0
	2	-	-	-	-	0
	3	-	-	-	-	0

Примітка: +++ – численні вузлики; ++ – декілька; + – поодинокі; - – специфічні зміни відсутні.

Аналізуючи таблицю 3.11, спостерігаємо, що індекс ураження внутрішніх органів мурчаків I групи склав $19 \pm 3,0$; II – $20 \pm 2,1$; III – $23 \pm 5,3$; IV – $27 \pm 0,6$; V – $11 \pm 2,6$; VI – $15 \pm 3,2$, VII – 0 балів.

Відмічаємо, що найбільш активний інфекційний процес спостерігається в мурчаків, які були інфіковані культурою, що отримана з суспензії з зерна на 12-ту добу експерименту, а найменш активний – в інфікованих культурою з суспензією з зерна на 20-ту добу. Отримані дані можуть свідчити, що під час перебування збудника в організмі рисового довгоносика спочатку відбувається поступове збільшення вірулентних властивостей *M. bovis*, а потім різке зниження до рівня нижчого за вихідний штам.

Також із досліджуваних внутрішніх органів та пахових лімфовузлів лабораторних тварин виготовляли мазки-відбитки. Мазки фіксували,

забарвлювали за методом Ціля-Нільсена та переглядали під мікроскопом. Визначили, що в I, II, III, IV та V групах виявлено дослідні мікобактерії в легенях 3-х свинок (100%), у печінці, селезінці, в пахових лімфатичних вузлах кислотостійкі палички виявлено в 3-х свинок (100%) у I, III та V групах, а в II та IV групах у 2-х (66,7%). У VI групі відповідні за морфологією мікобактерії виявлено в легенях та печінці 100% мурчаків, в селезінці – 66,7% тварин та в лімфовузлах 33,3% (1 шт) (рис. 3.34).

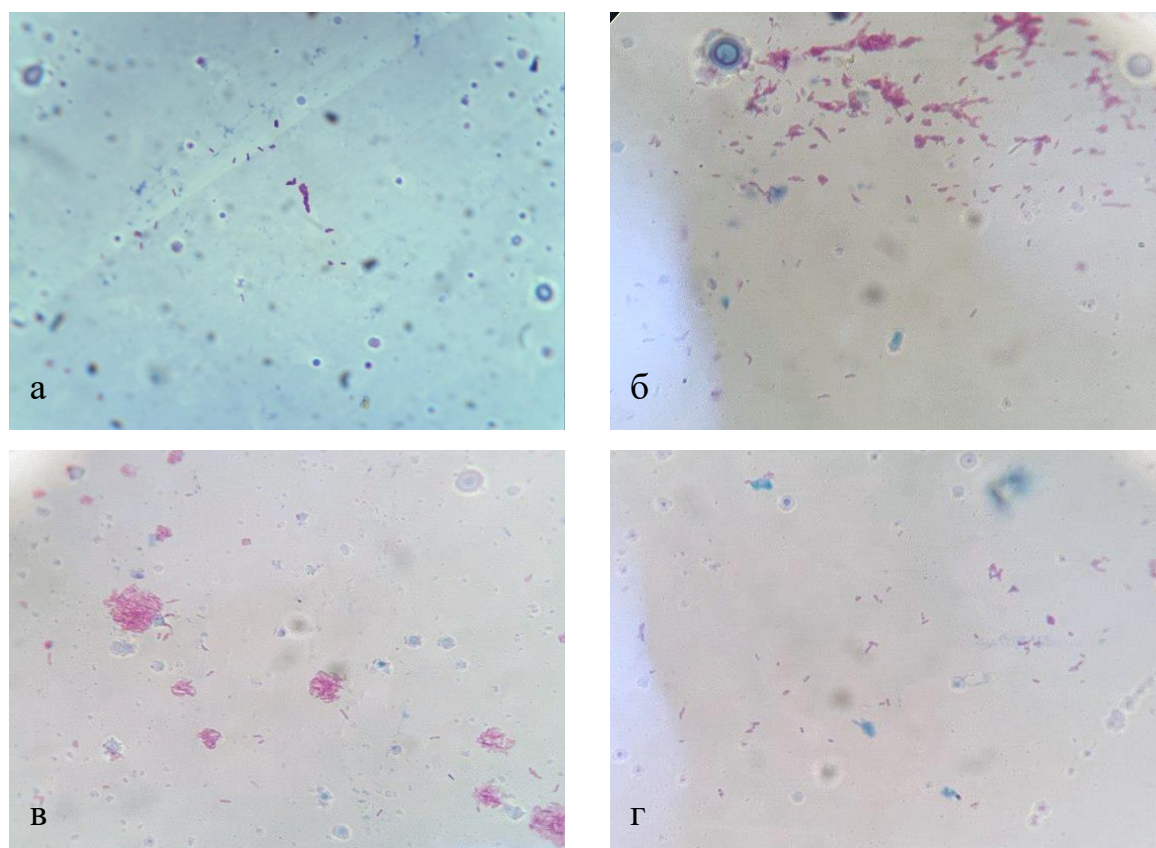


Рис. 3.34. Мазки відбитки з органів дослідних мурчаків: а – легені; б – печінка; в – селезінка; г – лімфатичні вузли (забарвлення за Цілем-Нільсеном, x1600)

При мікроскопії мазків-відбитків внутрішніх органів контрольної групи не виявлено дослідних мікроорганізмів (рис. 3.35).

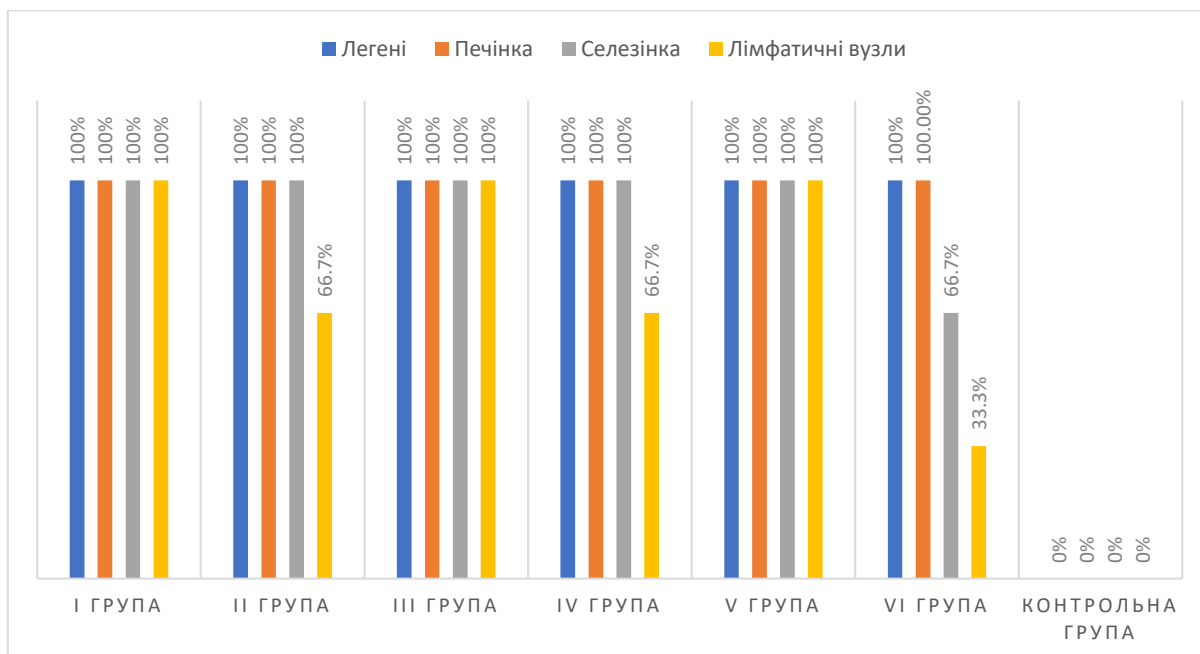


Рис. 3.35. Відсоток виявлення дослідних мікобактерій в мазках-відбитках органів лабораторних тварин

Варто зауважити, передивляючись мазки-відбитки під світловим мікроскопом встановлено, що мікобактерії не змінили морфологічні ознаки після пасажування через лабораторних тварин.

Шматочки патологічного матеріалу подрібнювали, готували суспензію згідно з методикою та висівали на живильне середовище Stonebrink. Ріст дослідного штаму спостерігали в посівах із внутрішніх органів від мурчаків I-VI групи. Первинний прояв відмічали на 14-26-ту добу при культивуванні за температури $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Слід зазначити, що найбільш тривало проявлявся ріст посівів із V дослідної групи, що, ймовірно, можна пояснити меншою кількістю життєздатних мікробних клітин у культурі, якою інфікували лабораторних тварин, порівняно з іншими дослідними культурами та нижчим індексом ураження макроорганізму. У пробірках із суспензією з матеріалу від контрольної групи ріст був відсутній.

Додатково шматочки уражених органів досліджували гістологічно. При гістологічному дослідженні в легенях мурчаків були масивні зливні лімфоїдно-макрофагальні інфільтрати з наявністю *периваскулярних лімфоїдних*

інфільтратів. Між інфільтратами визначалася тканина легень з ділянками підвищеної та значно зниженої повітряності. Спостерігався нерівномірно виражений проміжний набряк, потовщення міжальвеолярних перегородок з лімфоїдно-макрофагальною інфільтрацією. У масивних інфільтратах формувалися осередки некрозу, які зливаються, з лімфоїдно-макрофагальною інфільтрацією навколо (Рис. 3.36а; 3.36б). Відмічалось формування гранульом навколо округлих вогнищ некрозу з лімфоїдно-макрофагальною інфільтрацією навколо та наявністю гігантських багатоядерних клітин (Рис. 3.36в, 3.36г).

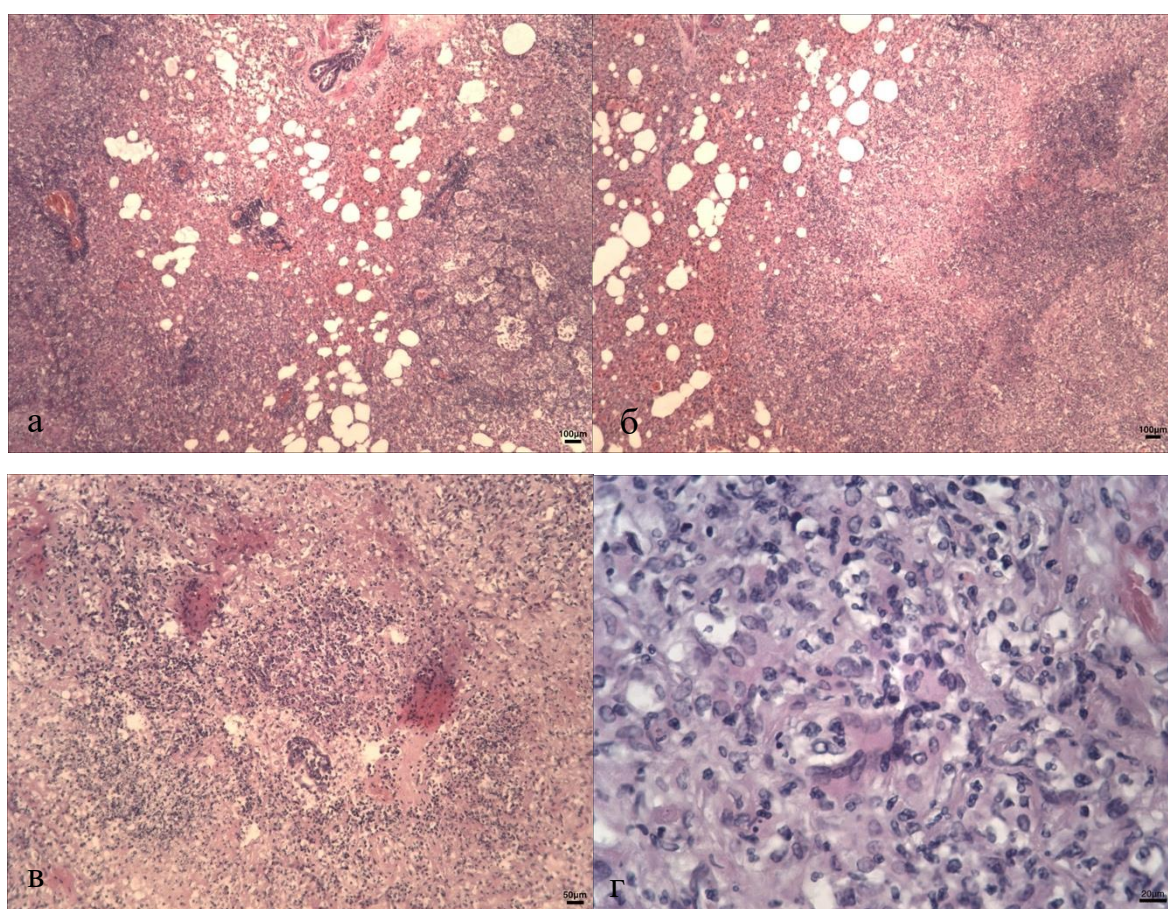


Рис. 3.36. Легені, забарвлення гематоксилін та еозин. а) Масивні зливні лімфоїдно-макрофагальні інфільтрати, периваскулярні лімфоїдні інфільтрати, bar = 100 μ m; б) Дифузно-вогнищева лімфоїдна інфільтрація, формування вогнищ некрозу, bar = 100 μ m; в) Дифузно-вогнищева лімфоїдна інфільтрація, формування гранульом навколо округлих вогнищ некрозу з лімфоїдно-макрофагальною інфільтрацією навколо, наявністю гігантських багатоядерних

клітин, bar = 50 μm . г) Дифузно-вогнищева лімфоїдна інфільтрація, гігантські багатоядерні клітини серед лімфоїдно-макрофагального інфільтрату, bar = 20 μm

Формування вогнищ некрозу відбувалося на фоні венулів з тромбозом та периваскулярною лімфоїдно-макрофагальною інфільтрацією. Спостерігався тромбоз дрібних вен, зустрічалися дрібні артерії з наявністю пристінкових тромбів (рис. 3.37а; 3.37б).

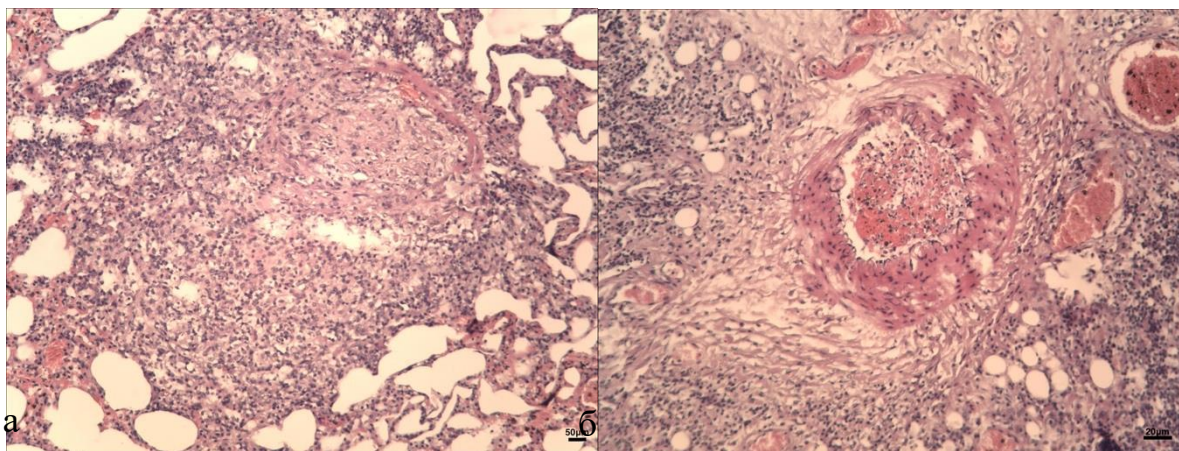


Рис. 3.37. Легені, забарвлення гематоксилін та еозин. а) Тромбоз вени. Периваскулярна лімфоїдно-макрофагальна інфільтрація, bar = 50 μm ; б) Артерія з пристіночним тромбозом, bar = 20 μm .

У селезінці відмічалась наявність масивних полів казеозного некрозу, що відмежований від тканини селезінки лімфоїдно-макрофагальним інфільтратом з наявністю епітеліоїдних клітин та фібробластів. Серед тканини селезінки спостерігалась велика кількість гранульом навколо осередків казеозного некрозу з лімфоїдно-макрофагальної інфільтрацією навколо, наявністю гігантських багатоядерних клітин типу Пирогова-Лангханса. (рис. 3.38а; 3.38б).

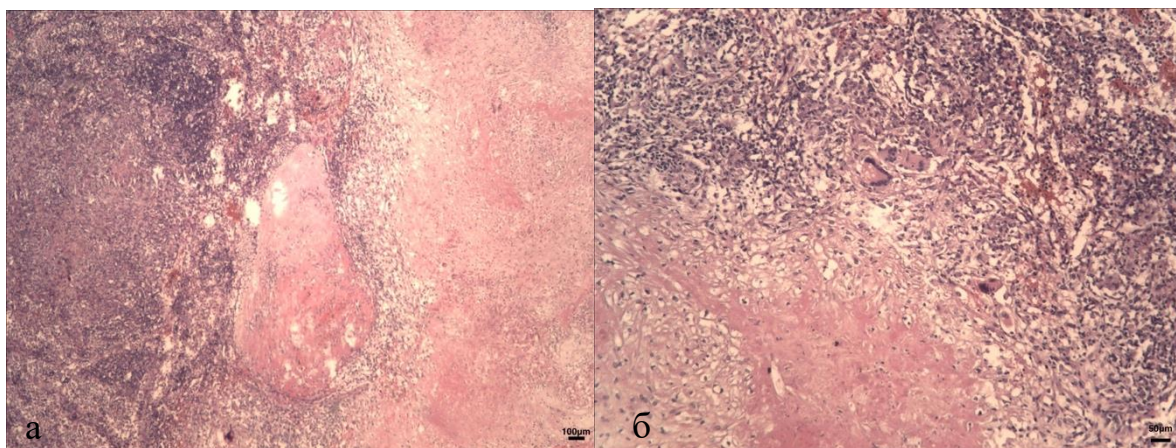


Рисунок 3.38. Селезінка, забарвлення гематоксилін та еозин. а) Масивні ділянки казеозного некрозу, bar = 100 μm ; б) Формування гранульоми навколо осередку казеозного некрозу з лімфоїдно-макрофагальною інфільтрацією навколо та наявністю гігантських багатоядерних клітин типу Пирогова-Лангханса, bar = 50 μm .

Тканина лімфовузла була повністю некротизована. Потовщена, інфільтрована лімфоцитами та макрофагами капсула лімфовузла відмежовувала некроз від навколишніх м'яких тканин (Рис. 3.39а; 3.39б).

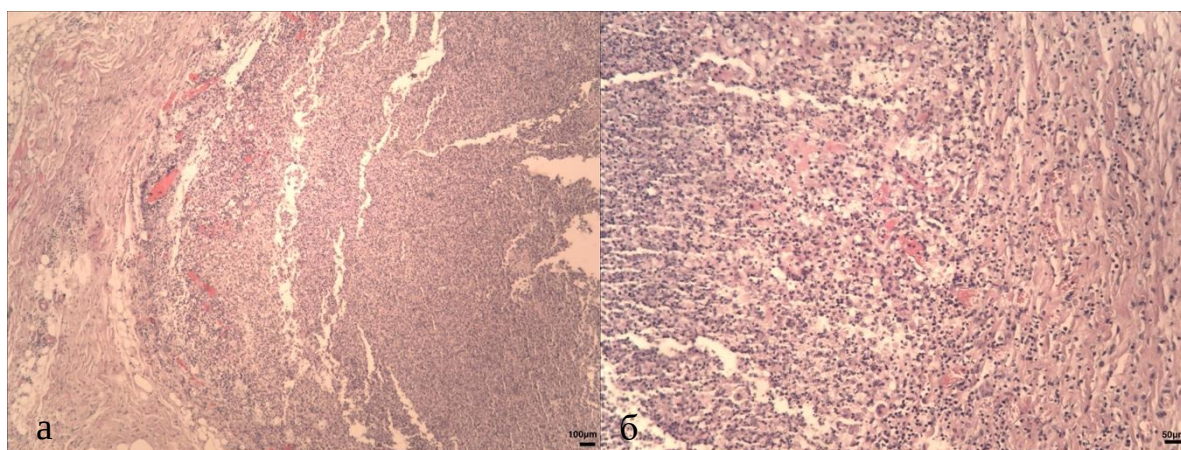


Рис. 3.39. Лімфатичний вузол, забарвлення гематоксилін та еозин. а) Масивний некроз тканини лімфовузла, bar = 100; б) Капсула лімфовузла потовщена, інфільтрована лімфоцитами та макрофагами, bar = 50.

Отже, аналізуючи, отримані результати біопроб, ми можемо стверджувати, що після пасажування через організм рисового довгоносіка

мікобактерії набули більшої патогенності на 12-ту добу перебування в організмі жука, загибель лабораторних тварин спостерігалась на 9 діб швидше (17,3%) порівняно з вихідним штамом, а індекс ураження збільшився з 19 до 27 балів, однак після більш тривалого пасажування (20 діб) патогенність навпаки знизилась, загибель мурчаків фіксувалась на 12 діб пізніше (23,0%), індекс ураження зменшився з 19 до 11 балів. Тобто, під час пасажування збудника в організмі жука спостерігаємо варіабельність його вірулентних властивостей.

3.5.2. Дослідження вірулентності *M. bovis* шляхом аліментарного інфікування лабораторних тварин у динаміці досліді на жуках

З метою визначення здатності рисового довгоносика контамінувати мікобактеріями об'єкти зовнішнього середовища в кількості достатній для аліментарного інфікування сприйнятливих тварин, що є високоймовірним шляхом у природному поширенні збудника, ми згодовували комахам зерно на якому жуки утримувались з багаторазовими пересадками. На даному етапі експерименту було створено IV дослідні та одна контрольна група: I група – мурчакам згодовували зерно, яке було контаміноване зависом культури, на якому жуки перебували впродовж 1-4-ї доби; II – зерно, на якому довгоносики знаходились впродовж 4-8-ї доби; III – зерно, на якому жуки перебували на 8-12-ту добу; IV – зерно, на якому жуки перебували впродовж 12-20 діб експерименту; V – контрольна група, згодовували лише стерильне (автоклавоване) зерно.

Мурчаки набирали вагу та залишались активними до 49-56-ї доби, що помітно триваліше за тварин, які були підшкірно інфіковані зависом мікобактерій, після чого почали поступово худнути, однак жодних інших клінічних ознак не спостерігалось (рис. 3.40).

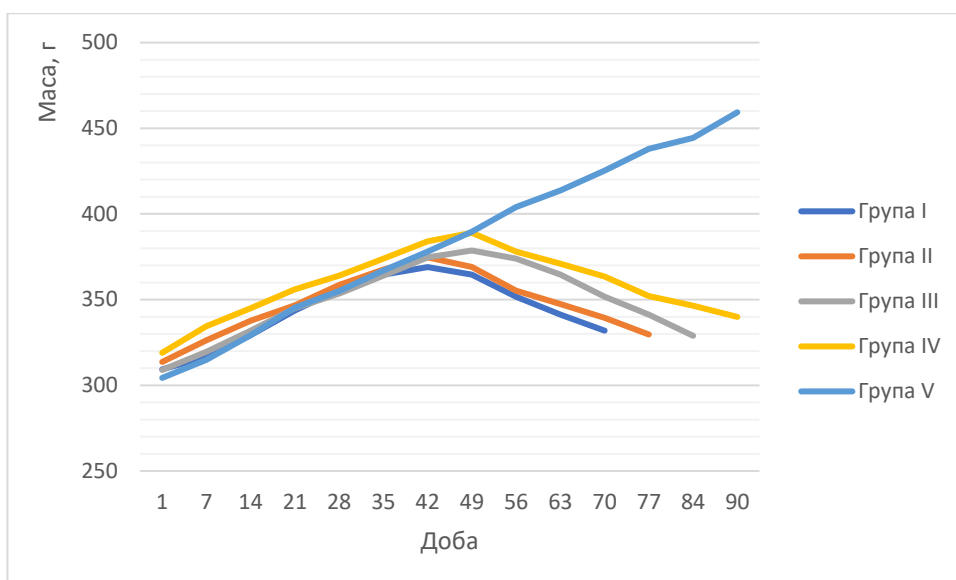


Рис. 3.40. Динаміка зміни маси тіла дослідних мурчаків впродовж експерименту

Результат туберкулізації на 30-ту добу був негативним у всіх дослідних тварин, на 60-ту – позитивний у I, II, III, IV групах, на 90-ту добу - позитивний у IV групи. Тварини V групи не реагували на введення ППД-туберкуліну (рис. 3.41).

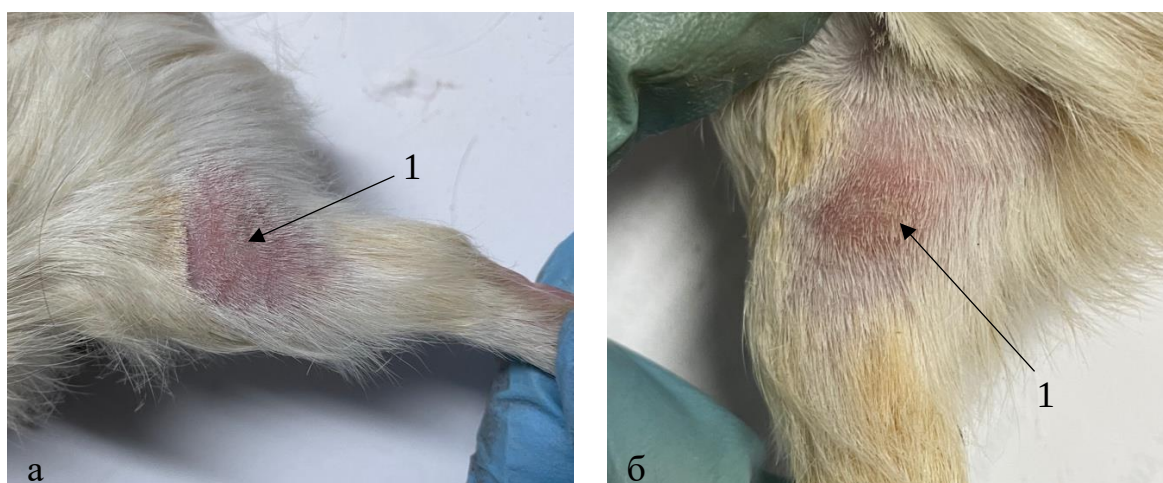


Рис. 3.41. Облік туберкулізації після введення ППД-туберкуліну: а – через 24 год; б – через 48 год після інокуляції; 1- припухання шкіри

Загибель тварин I групи спостерігалась на $72 \pm 1,7$ добу; II – на $78 \pm 4,0$ добу; III – на $87 \pm 1,7$ добу; IV та V – евтанізовано через 90 діб.

Оцінюючи патологоанатомічні зміни встановили, що за аліментарного інфікування ураження менш виражені, а їх основною локалізацією є печінка, поодинокі осередки казеозних уражень легень виявлені лише в мурчаків I та II груп, характерних уражень селезінки не виявляли в жодній групі, однак вона була збільшена з ознаками некрозу. Досліджуючи мезентеріальні лімфатичні вузли характерних для туберкульозу змін не виявлено, однак відмічали незначне збільшення у розмірі. У кишечнику спостерігали гіперемію судин, специфічні вузлики в кишковому тракті та черевній порожнині були відсутні (рис. 3.42).



Рис. 3.42. Патологоанатомічні зміни дослідних тварин : а – легені; б, в – печінка; г – гіперемія судин у ШКТ; 1 – туберкули з казеозним вмістом;

Тварини контрольної групи не мали характерних змін (табл. 3.12).

Таблиця 3.12 – Індекс ураження органів дослідних мурчаків за експериментального внутрішньошкірного інфікування зависом мікобактерій

№ групи	№ тварини	Специфічні ураження (наявність туберкул)				Індекс ураження
		Легені	Печінка	Селезінка	Ліфатичні вузли	
I	1	+	+++	-	-	13
	2	++	+++	-	-	17
	3	+	+++	-	-	13
II	1	+	++	-	-	10
	2	+	++	-	-	10
	3	+	+++	-	-	13
III	1	-	++	-	-	6
	2	-	++	-	-	6
	3	-	+	-	-	3
IV	1	-	+	-	-	3
	2	-	++	-	-	6
	3	-	-	-	-	0
V	1	-	-	-	-	0
	2	-	-	-	-	0
	3	-	-	-	-	0

Примітка: (+++) – численні вузлики; (++) – декілька; (+) – поодинокі; (-) – специфічні зміни відсутні.

Аналізуючи отримані дані, що висвітлені в таблиці 3.12, бачимо, що індекс ураження організму зменшувався при інфікуванні зерном із кожною наступною пересадкою: I група – $13,3 \pm 3,5$; II - $11 \pm 1,7$; III - $5 \pm 1,7$; IV - $3 \pm 3,0$; V – 0 балів.

На нашу думку, це об'єктивно пов'язано зі зменшенням кількості мікобактерій у зерні при кожному перенесенні жуків на стерильну пшеницю, а варіабельність прояву патологоанатомічних змін усередині групи пояснюється

тим, що нам невідома точна кількість захоплених мікробних клітин конкретною твариною.

При мікроскопічному дослідженні мазків-відбитків з органів мурчаків виявлено мікобактерії в легенях I та II групи 100% тварин, III – 66,7%, IV – 33,3%, в печінці I-IV груп – у 100% свинок, у селезінці I та II груп – 33,3%, у III-IV – кислотостійкі палички були відсутні, у мазках із мезентеріальних лімфовузлів не виявлено збудник у жодній експериментальній групі тварин (рис. 3.43). У мурчаків контрольної групи мікобактерії в дослідних органах не виявлено.

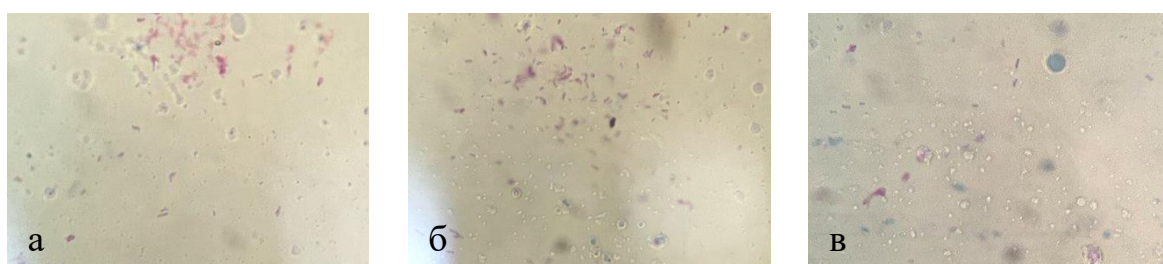


Рис. 3.43. Мазки відбитки з органів дослідних мурчаків: а – легені; б – печінка; в – селезінка
(забарвлення за Цілем-Нільсеном, x1600)

З подрібнених шматочків внутрішніх органів готували суспензію, яку висівали на живильне середовище Stonebrink. Ріст культури спостерігали в посівах з матеріалу від I-IV груп при культивуванні за температури $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, первинний прояв фіксували на 17 - 31 добу, що триваліше в 1,2-1,9 разів за вихідну культуру.

Отримані дані дають підставу стверджувати про можливість поширення туберкульозу в природі методом контамінації об'єктів навколишнього середовища комахами й наступним потенційним зараженням сприйнятливих тварин.

Результати досліджень наведені в цьому підрозділі опубліковані у працях: [1-2; 90; 105-106; 108-11; 129].

У розділі 3 використано матеріали з відповідним посиланням на такі наукові джерела зі списку літератури: [120; 145; 159].

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Проблема стрімкого поширення туберкульозу серед тварин та людей є актуальною впродовж багатьох років по всьому світу, в тому числі й в Україні. Мікобактерії туберкульозу — бактерії, що володіють надзвичайною стійкістю до дії фізичних та хімічних факторів за рахунок наявності ліпідів у складі клітинної стінки та здатністю до мінливості з метою адаптації мікроорганізмів у несприятливому для нього середовищі й протистояння захисним силам організму (Bañuls et al., 2015).

Збудник здатний змінювати як генотипові, так і фенотипові ознаки. З метою виживання мікобактерії можуть міняти свої морфологічні ознаки, культуральні властивості, а також вірулентність та ферментативну активність. Типовим прикладом мінливості збудника є дисоціація мікобактерій. Для дисоціативних форм *M. bovis* характерною є зміна метаболічних процесів бактеріальної клітини, що сприяє широкому діапазону виживання мікроба в зовнішньому середовищі (Tkachenko et al., 2020). Популяція дисоціантів відрізняється від вихідного штаму морфологією, культуральними та біологічними властивостями. Зважаючи на особливості мікобактерій, при накопичені субкультури збудника (пасаж №№100, 117-а, 118) першочергово встановили оптимальний режим культивування посівів, визначали їх морфологію, культуральні та біологічні властивості й порівнювали з вихідним (материнським) штамом. При пересіві встановили, що субкультури не мали значних відмінностей від вихідних штамів. Первинний ріст дисоціантів спостерігався на 3-11 добу, що відповідає тривалості прояву росту вихідних культур.

Дисоціативні форми *M. bovis* (117-а та 118 пасажі) проявляли ріст при різних температурних режимах, однак для пасажу №117-а більш оптимальною є температура $3,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$, а для №118 — $37,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$, за вказаних режимів інтенсивність росту була більшою, а тривалість інкубування зменшувалась. Субкультури обох пасажів формували на живильному середовищі колонії

правильної форми з гладенькою поверхнею (S-форми). Обидва варіанти здатні до пігментоутворення: 117-а — помаранчевий, 118 — блідо-помаранчевий. Усі варіанти мали задовільну здатність до емульгації у фізіологічному розчині та здатні рости на простих живильних середовищах. Слід зазначити, що субкультури мікобактерій 117-а пасажу набули в'язкої консистенції та слабого блиску поверхні колоній.

У мазках дисоціантів забарвлених за методикою Ціля-Нільсена виявляли прямі коротенькі некислотостійкі палички (117-а пасаж) та кислотостійкі зерна (118-ий пасаж), що розміщувались переважно скупченнями, рідше поодинокі, зернистість була слабо виражена в пасажі 118 та добре виражена в пасажі 117-а. Усі варіанти не містили L-форм та елементарних тілець.

Прояв росту патогенного штаму виявляли на 14-16-ту добу, що швидше на 53,6% порівняно з вихідним штамом, ми вважаємо, що це пов'язано з використанням більш адаптованого живильного середовища «Stonebrink». Ріст материнського штаму та субкультур не відрізнялись між собою, виявляли чисельні крихкі колонії неправильної форми з матовою та шорсткою поверхнею (R-форми), які не здатні до емульгації в фізіологічному розчині та не ростуть на простих живильних середовищах. Під імерсійною системою мікроскопа в усіх варіантах культур виявляли кислотостійкі короткі прямі палички з заокругленими кінцями та вираженою зернистістю, що розміщувались поодинокі та скупченнями, L-форми та елементарні тілця відсутні.

Аналізуючи дослідження наукових співробітників (Ткаченко, 2017) кафедри інфекційних хвороб тварин ДДАЕУ, де описуються властивості цих культур та порівнюючи отримані дані можемо стверджувати, що геном збудника є досить стійким та зберігає основні морфологічні, тинкторіальні та культуральні особливості.

Підтримка життєдіяльності мікобактерій у навколишньому середовищі відіграє важливу роль в поширенні туберкульозу. Всупереч багаторічній плідній роботі вчених усього світу, дотепер немає вичерпних даних щодо всіх можливих шляхів занесення збудника на раніше благополучну територію. А з метою

повного викорінення хвороби першочерговим завданням має бути розширення та поглиблення знань з профілактики та недопущення туберкульозної інфекції.

Особливої уваги, на нашу думку, заслуговує встановлення можливих резервуарів мікобактерій, які є потенційною загрозою спалахів інфекції.

Численні результати досліджень вчених усього світу доводять, що комахи є резервуаром багатьох видів мікроорганізмів. Науковцям вдалось ізолювати мікобактерії від тарганів, жуків, метеликів, кліщів, москітів та інших безхребетних (Fotedar et al., 1989; Fischer et al., 2004b; Wallace et al., 2010). За даними багатьох науковців, комахи — переносники умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів у тому числі й збудника туберкульозу. Зокрема, були виділені з їх організму *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium avium* ssp., *Mycobacterium fortuitum*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* та інші види бактерій (Nwankwo et al., 2016; Memona et al., 2017; Zarei et al., 2018).

Існуючі дані свідчать про здатність комах накопичувати та виділяти мікобактерії в зовнішнє середовище, тобто бути потенційною причиною активного поширення захворювання. Подібні припущення висунули й ряд інших науковців (Kazda, 2000; Portaels et al., 2001; Marsollier et al., 2002; Durnez et al., 2008), які припускають теорію, що тварини можуть бути інфіковані мікобактеріями через покуси комах та повідомляють, що водяні клопи з родини *Naucoridae* здатні передавати мікобактерії гризунам через покуси. Kazda (2000) пояснює, що мікобактерії завдяки структурі клітинної стінки є стійкими проти дії шлункових ферментів комах, внаслідок чого вони можуть виділятися як з їх слиною, так і з фекаліями. У результатах дослідження Durnez et al. (2008) знаходимо повідомлення про виділення мікобактерій з організму комахоїдних тварин. Потрапляння мікобактерій у їх організм виникло, ймовірно, внаслідок поїдання інфікованих комах. Відомі дані дають змогу припускати, що інфіковані мікобактеріями комахи можуть бути захоплені сприйнятливими до туберкульозу тваринами чи птахами й перетравлені, а кислотостійкі мікобактерії, зі свого боку, залишаються життєздатними та можуть персистувати в організмі й виділятися в

зовнішнє середовище. Тобто, комахи можуть бути потенційною причиною активного поширення захворювання. Проте, на сьогодні немає вичерпних даних щодо тривалості носійства мікроорганізмів, зокрема мікобактерій туберкульозу, в організмі комах та невизначена кількість збудника, яка необхідна для їх контамінації. А повна ліквідація захворювання без досконалих знань потенційних резервуарів і носіїв збудника хвороби є неможливою. Маловивченість цього питання спонукала нас поглибити існуючі знання методом проведення ряду наукових досліджень.

Для експериментального інфікування рисових довгоносиків використовували зерно пшениці, яке контамінували зависом мікобактерій у різній концентрації. За результатами мікроскопічного дослідження змивів із поверхні тіла та гомогенізату жуків із різних груп визначили, що концентрація мікобактерій (дисоціативного та вірулентного штамів) 10 мг в 1 см³ 0,9 % розчину натрію хлориду на 10 гр пшениці є достатньою для інфікування всіх екземплярів жуків, які утримувались в контамінованому субстраті. Варто зауважити, що дослідні мікобактерії виявлені як на поверхні тіла жука, так і всередині його організму, що демонструє здатність рисового довгоносика до резервування та механічного перенесення збудника інфекції. У своїх дослідженнях науковці Fischer et al., (2004a) експериментально інфікували зависом *M. avium* та *M. paratuberculosis* личинок виду *T. molitor* *Z. atratus* й визначили, що вони здатні до накопичення та виділення збудника в зовнішнє середовище. Для зараження вчені використали 2 мл мікобактеріального завису на кожні 5 мл субстрату, що менше від кількості культури, яка знадобилась нам для інфікування всіх зразків рисових довгоносиків. Порівнюючи описані ними дані з нашими, ми можемо стверджувати, що кількість культури необхідно для інфікування може варіюватись залежно від кількості життєздатних мікроорганізмів, виду мікобактерій та комах.

Для визначення здатності комах до механічного перенесення життєздатних мікобактерій, після перебування в контамінованому субстраті, жуків переносили

в пробірку з живильним середовищем, де вони могли вільно пересуватися. Після вилучення жуків пробірки інкубували та спостерігали за проявом росту.

Поява росту свідчить про здатність комах до механічного перенесення збудника на поверхні тіла та до контамінації об'єктів зовнішнього середовища, як наслідок, комахи можуть брати участь в активному поширенні туберкульозу й передачі збудника інфекції сприйнятливим тваринам.

Після вилучення дослідних жуків із пробірки, комах промивали в фізіологічному розчині та гомогенізували на предметному скельці, отриманий гомогенізатор забарвлювали за методом Ціля-Нільсена та досліджували під імерсійною системою мікроскопа. У полі зору виявляли дослідні мікобактерії, зависом яких було контаміновано зерно. Такі результати демонструють здатність рисового довгоносика не тільки до механічного перенесення, а й до накопичення збудника всередині організму.

Sarwar (2015) повідомляє, що в 85% випадках причиною виникнення хвороб є членистоногі, які здатні до поширення збудника як на поверхні тіла комах, так і через покуси. На думку автора найбільшу небезпеку несуть мухи (звичайна кімнатна та велика хатня), які можуть переносити бактерії, віруси, найпростіших та навіть гельмінтів. Аналогічні дані наводять й інші автори (Alves et al. 2018; Karami et al. 2020; Nha Yen et al. 2022), які стверджують, що комахи відіграють провідну роль в механізмі поширення хвороб.

Проаналізувавши літературні джерела та отримані нами дані, ми змоделювали інфікування рисових довгоносиків методом утримання їх у контамінованому зависом мікобактерій зерні пшениці. Нам необхідно було визначити здатність до накопичення рисовими довгоносиками мікобактерій та встановити яка тривалість зберігання збудника в організмі жука після захоплення збудника та як впливає пасажування через комах на морфологію та біологічні властивості бактерій.

Для цього перед інфікуванням довгоносиків 20% жуків гомогенізували на предметному скельці, фіксували гомогенізатор й забарвлювали за методом Ціля-Нільсена та досліджували під мікроскопом для виключення природного

носійства мікобактерій, після чого проводили дослідження. На контамінованому зерні утримували жуків протягом трьох діб, після чого пересаджували в стерильну пшеницю на 4-ту, 8-му, 12-ту, 20-ту та надалі кожні 10 діб до 90-ї доби включно. Під час кожної пересадки відбирали по два довгоносики, п'ятикратно промивали їх в ізотонічному розчині натрію хлориду та гомогенізували комах. Промивання жука проводили з метою видалення мікобактерій з поверхні тіла. Змиви й гомогенізатор фіксували на предметному скельці та забарвлювали за методом Ціля-Нільсена. Після кожної пересадки відмічали тенденційне зниження кількості дослідних мікобактерій у полі зору мікроскопа, тривалість виділення збудника в організмі жука була більшою, ніж на поверхні тіла. Отримані дані свідчать, що рисовий довгоносик – потенційний резервуар збудника інфекції.

Окрім мікроскопічного дослідження проводили й культуральне. На живильне середовище висівали гомогенізатор із жуків та суспензію з зерна після кожної пересадки для встановлення життєздатності збудника, що знаходиться всередині організму комахи й після виділення його в зовнішнє середовище. У вирослих посівах визначали культуральні, біохімічні та біологічні властивості, морфологію мікробних клітин і кількість КУО та порівнювали отримані дані з вихідними культурами, що не піддавались впливу рисового довгоносика.

Проаналізувавши культуральні властивості, можемо зазначити, що основною відмінністю вихідних і отриманих культур, як вірулентного, так і дисоціантивного штамів є збільшення тривалості появи первинного росту та незначне зниження інтенсивності росту колоній.

При мікроскопічному дослідженні морфології отриманих мікробних колоній визначили, що вони були ідентичними до ознак вихідних культур.

Нами встановлено, що рисові довгоносики здатні до резервування та виділення життєздатних мікобактерій у зовнішнє середовище, а організм жука не призводить до значних змін морфологічних ознак і культуральних властивостей збудника. Таким чином, ймовірно, комахи цього виду є сприятливим середовищем для мікобактерій.

У дослідженні Portales et al. (1999) знаходимо схожі дані, автори стверджують, що водні комахи є оптимальним середовищем для мікобактерій, зокрема *M. ulcerans*.

У роботі Шендрик І. М. (2016) дисоціативні штами мікобактерій пасажували через організму личинок виду *Strongyloides papillosus* після чого визначали морфологію та тинкторіальні властивості збудника, було встановлено, що дисоціанти не змінюють свої ознаки після проходження через організм гельмінта.

Досліджуючи біохімічну активність виявляли, що показники ферментативної активності мікобактерій є варіабельними. Мікобактерії патогенного штаму *M. bovis* не володіють яскраво вираженою біохімічною активністю, а дисоціативні форми збудника здатні набувати властивостей атипичних мікобактерій і мають виражену активність ферментативних систем (Ткаченко, 2017).

У нашій роботі досліджуючи дисоціативний штам мікобактерій встановили, що після пасажування збудника через організм рисового довгоносика спостерігається підвищення дегідрогеназної та нітратредуктазної активності. При проходженні через організм жука вірулентного штаму *M. bovis* зміни біохімічної активності були менш вираженими, однак відмічалось незначне посилення активності дегідрогенази та нітратредуктази після 12-ти діб перебування збудника в організмі довгоносика.

Li et al. (1998) та Manca et al. (1998) стверджують, що активність каталази сприяє стійкості та виживанню мікроорганізмів, автори описують, що наявність каталазної активності забезпечує виживання збудника за дії перекису водню майже вдвічі порівняно зі штамми, де дана активність була негативною, також науковці припускають, що даний фермент є фактором вірулентності мікобактерій. Однак у наших дослідженнях ми не знайшли підтвердження цьому припущенню.

Дегідрогеназна активність базується на виявленні окисно-відновного ферменту дегідрогенази і продуктів метаболізму. Даний фермент відповідає за

захист бактеріальної клітини та адаптацію в умовах макроорганізму, приймає участь у забезпеченні антиоксидантної функції мікроба. У наших результатах ми спостерігаємо підтвердження існуючих даних, активність дегідрогенази зростає після контакту мікобактерій з жуками. Аналогічні дослідження демонструють й інші наукові роботи, що вказують на підвищення активності цього ферменту після проходження через живий організм (Tkachenko et al., 2021).

Fritz (2002) стверджує на прикладі *M. bovis BCG*, що нітрати є важливими для метаболізму мікробної клітини та приймають участь в забезпеченні її енергією, більш того, здатні підтримувати метаболізм навіть за відсутності кисню. Результати досліджень ряду вчених стверджують, що активність нітратредуктази частково відповідає за виживання мікобактерій в клітинах господаря (Weber, et al., 2000; Sohaskey, 2008; Hayashi et al., 2010). Отримані результати, згідно яких непатогенні дисоціативні форми мікобактерій стабільно здатні до редукції нітратів, а патогенний штам набув слабкої активності даного ферменту лише після тривалого перебування збудника в організмі рисового довгоносика не суперечать дослідженням Sohaskey et al. (2009), який стверджує, що тільки вірулентний штам *M. bovis* володіє незначною активністю нітратредуктази та роботі Martin et al. (2005), де вказується, що штам вважається стійким, якщо володіє нітратредуктазною активністю. Водночас Weber et al. (2000) висвітлюють зворотню інформацію, що вірулентними є штами мікобактерій (на прикладі *M. bovis BCG*), які здатні редукувати нітрати. У своєму експерименті вони шляхом делеції видалили ген, який відповідає за активність нітратредуктази, після чого інфікували мишей вихідним штамом *M. bovis BCG*, який редукує нітрати й мутантом, який втратив цю здатність. У результаті всі миші, які були заражені вихідним штамом проявляли характерні клінічні та патологоанатомічні зміни й гинули через 80 діб. Водночас миші, які інфіковані мутантом, не мали прояву захворювання й не гинули.

Враховуючи протилежність існуючих даних, можна зробити висновок, що спираючись тільки на здатність мікобактерій до редукції нітратів не можна однозначно характеризувати патогенність штаму. Можна припустити, що

активність даного ферменту не має прямого відношення до вірулентності збудника.

Здатність мікобактерій до гідролізу ТВІН-80 забезпечує мікобактеріальна фосфоліпаза А, яка каталізує гідроліз ліпідів. Суть реакції полягає в тому, що ТВІН-80 зв'язує нейтральний червоний і до реакції дослідний розчин має солом'яно-жовтий колір, але за рахунок звільнення нейтрального червоного, відбувається відновлення кольору від рожевого до червоного (за позитивної реакції). Згідно припущення Jackson et al. (1989) та Deb et al. (2009) ця активність може сприяти виживанню бактеріальної клітини в умовах голодування. Wayne (1994) повідомляє, що ТВІН-80 може використовуватись збудником як джерело вуглецю. Водночас за даними ряду дослідників (Van Boxtel et al., 1990) ТВІН-80 збільшує чутливість комплексу *M. avium* до протитуберкульозних засобів шляхом збільшення проникності клітинної стінки мікобактерій.

Отримані дані дозволяють припускати, що зміна біохімічних показників мікобактерій відбуваються як наслідок посилення виживання та адаптації мікроба до нових умов оточуючого середовища. Наше припущення не суперечить іншим дослідженням щодо високого ступеня мінливості біологічних властивостей *M. bovis*, в тому числі й біохімічної активності (Tkachenko et al., 2020). Разом із цим слід зазначити, що ідентифікація мікобактерій виключно за ферментативною активністю збудника не є достовірною через велику ймовірність лабільності даних показників.

Комахи становлять потенційну небезпеку поширення мікобактерій у навколишньому середовищі, однак їх роль у виникненні хвороби достовірно невідома. Ma et al. (2021) описують, що в зовнішньому середовищі комахи знаходяться під постійною загрозою до інфікування екзогенними збудниками, а їх шлунково-кишковий тракт є першочерговими воротами проникнення. Проходячи через епітелій кишечника збудник здатен до накопичення та розмноження (Blanc et al., 2014).

Попередньо встановивши тривалість резервування мікобактерій в організмі рисового довгоносика, ми експериментально відтворили процес

інфікування лабораторних тварин двома способами: аліментарно та внутрішньошкірно.

Аліментарний метод полягав у згодовуванні зерна пшениці на якому перебували інфіковані жуки до кожної наступної пересадки. Внутрішньошкірним методом інфікували мурчаків зависом культури, що був отриманий в динаміці експерименту шляхом посіву на спеціальне живильне середовище гомогенізату дослідних довгоносиків та суспензії з зерна на якому вони утримувались.

Спостерігаючи за змінами загального стану мурчаків протягом 90 діб встановлювали вплив рисового довгоносика на патогенність мікобактерій, оцінювали здатність збудника зберігати та відновлювати вірулентні властивості після проходження через організм жука.

Внутрішньошкірний метод інфікування надважливий, так як такий спосіб зараження є загальноприйнятим у лабораторних умовах і є об'єктивним, оскільки нам достовірно відома кількість мікробних клітин, що потрапила до організму лабораторної тварини. До того ж при покусах інфікованою комахою, слина зі збудником потрапляє саме внутрішньошкірно. Аліментарний метод – є високовірогідним способом природного зараження, коли комаха контамінує корм мікобактеріями, а сприйнятлива тварина його захоплює.

Проводячи біологічну пробу культурою дисоціативного штаму *M. bovis*, спостерігали за мурчаками протягом 90 діб. За вказаний період жодна лабораторна тварина не загинула, мурчаки були активними й набирали вагу, не реагували на введення ППД-туберкуліну, після завершення дослідження тварин евтанізували, провели патологоанатомічний розтин й з'ясували, що індекс ураження внутрішніх органів – 0 балів у всіх дослідних групах. Однак при посіві суспензії з внутрішніх органів та лімфатичних вузлів на живильне середовище відмічали прояв росту дисоціантів у всіх дослідних групах, крім інтактної, що свідчить про перебіг доброякісного інфекційного процесу. На основі отриманих даних, можемо стверджувати, що рисовий довгоносик є оптимальним

резервуаром для мікобактерій, однак пасажування через організм комах не призводить до відновлення вірулентних властивостей збудника.

Проходження збудника через макроорганізм не здатне призводити до відновлення патогенності авірулентних мікобактерій. Разом із тим, у разі, коли непатогенні мікобактерії здатні викликати недоброякісний інфекційний процес, це може свідчити про те, що культура містила патогенні субпопуляції, які викликали яскравий прояв клінічної картини. Також Converse et al., (2010) стверджує, що пасажування штамів, що втратили патогенні властивості, через макроорганізм, використовуючи модель пацюків та мурчаків, не відновлює ефективність авірулентних штамів.

На відміну від дисоціантів, при проведенні біологічної проби вірулентним штамом *M. bovis* спостерігали варіабельність патогенних властивостей у процесі проходження збудника через організм рисового довгоносики. При внутрішньошкірному інфікуванні культурами мікобактерій, що були виділені в процесі експерименту, на основі доби загибелі дослідної тварини, індексу ураження внутрішніх органів та мікроскопії мазків-відбитків з уражених органів, відмічали посилення патогенності збудника після перебування його в організмі жука впродовж 12-ти діб, натомість після більш тривалого перебування – вірулентність знижувалась.

Тобто, можна стверджувати, що рисові довгоносики є сприятливим середовищем для мікобактерій і можуть становити загрозу поширення туберкульозу. Варіабельність патогенних властивостей ми пояснюємо «законом зростаючої вірулентності», на який зробив огляд Роберт Кох. Першочергово цей закон відкрив Казимір Давен при дослідженні сибірки. Згідно нього початкове пасажування збудника через організм лабораторних тварин може виділяти мікроорганізми, які є більш патогенними в залежності від культури, ніж інші (Brook T, 1988).

Водночас при аліментарному інфікуванні мурчаків (зерном на якому перебували жуки після кожної пересадки комах) спостерігали зниження прояву патогенного впливу з кожним наступним перенесенням. Ми пов'язуємо це явище

зі зменшенням кількості мікроорганізмів у часі, що виділяли жуки в зерно. Однак відзначаємо, що при вживанні контамінованого корму сприйнятливі тварини здатні інфікуватися.

У роботі Gao et al. (2018) описується аліментарний спосіб зараження. Дослідники випоїли мурчакам воду, яка була контамінована мікобактеріями та з'ясували, що тварини можуть бути інфіковані таким шляхом. Вчені стверджують, що клінічні та патологоанатомічні зміни в тварин, які були заражені аліментарно є аналогічними до тих, що були виявлені у мурчаків, які заражались аерогенним та підшкірним шляхом. Однак у нашому дослідженні при аліментарному інфікуванні мурчаків спостерігали виражений тропізм збудника в печінці та кишечнику, в той час як у легенях ми не спостерігали яскраво виражених характерних змін.

При дослідженні життєздатності мікобактерій у процесі експерименту відмічали поступове зниження кількості КУО з кожною наступною пересадкою, що свідчить про зменшення рівня життєздатності після перебування збудника в організмі довгоносіка.

Автори Smeulders et al. (1999) у своїй роботі повідомляють на прикладі *M. smegmatis*, що мікобактерії даного виду зберігають свою життєздатність більше 650 діб, однак при цьому спостерігається зниження життєздатності збудника (зменшення кількості КУО).

Аналізуючи наші результати, на фоні зниження кількості КУО в мікробній клітині відбувається активізація механізмів адаптації на зміну середовища існування, підвищується активність окисно-відновних ферментів та відбувається забезпечення мікробної клітини енергією шляхом посилення редукції нітратів.

У розділі 4 використано матеріали з відповідним посиланням на такі наукові джерела зі списку літератури: [3; 7; 13-14; 18; 20; 22; 27-28; 37; 39-40; 45; 49; 54; 58; 62-63; 65; 67; 69; 73-74; 77-78; 82-84; 80; 88-89; 95; 97-99; 102; 159; 168].

Висновки

У дисертаційній роботі наведені нові теоретично та експериментально обґрунтовані результати досліджень, що в сукупності вирішують наукову проблему, яка полягає в здатності рисового довгоносика (лат. *Sitophilus oryzae*) механічно переносити мікобактерії туберкульозу, резервувати їх у своєму організмі та виділяти життєздатного збудника в зовнішнє середовище. З'ясована оптимальна концентрація мікробного завису для контамінації зерна та подальшого інфікування комах. Встановлено, що *M. bovis* дослідних штамів (пасажі № 117-а, 118, 100) мають стійкий геном і зберігають вихідні культуральні властивості та морфологію після пасажування через рисового довгоносика. Показано пластичність ферментативної активності та патогенних властивостей мікобактерій залежно від тривалості перебування збудника в організмі жука.

1. Вихідні культури дослідних штамів і отримані субкультури володіли ідентичними властивостями. Мікобактерії 117-а пасажу на живильному середовищі формували гладенькі колонії S-форми, оптимальною температурою росту виявилось $3,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Морфологічно бактерії паличкоподібні, за тинкторіальними властивостями – некислотостійкі. Ріст пасажу №118 характеризувався гладенькими колоніями, оптимальна температура культивування $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, морфологічно збудник мав вигляд кислотостійких зерен. Ріст 100-го пасажу *M. bovis* мав вигляд окремих колоній R-форми, за тинкторіальними властивостями бактерії кислотостійкі, морфологічно – паличкоподібні форми з вираженою зернистістю.

2. Розроблено методику аліментарного інфікування мікобактеріями жуків. Визначено, що оптимальною концентрацією для контамінації збудником дослідних рисових довгоносиків є 10 мг на кожні 10 г зерна пшениці незалежно від ступеня патогенності дослідного штаму.

3. Пасажування мікобактерій через організм комах не призводить до змін у геномі мікроорганізмів, які можна було б ідентифікувати методом VNTR-генотипування, а саме не відбулося змін у кількості тандемних повторів у варіабельних локусах, які були досліджені. Морфологія, тинкторіальні та

культуральні властивості збудника зберігаються, однак час появи росту збільшується в 4,0-13,3 (118-й пасаж) та 1,2-1,7 (100-й пасаж).

4. Тривалість виявлення дослідних форм *M. bovis* в організмі жуків становила 30-50 діб після інфікування, залежно від штаму мікобактерій, однак життєздатність збудник зберігав тільки до 30-ї доби. Виділення мікобактерій жуками у зовнішнє середовище відмічалось до 12-30 доби. Дисоціативні форми (пасаж №118) перебували в організмі довгоносика довше за вірулентний штам (100-й пасаж).

5. Досліджуючи ферментативну активність вихідної культури дисоціативних форм *M. bovis* (117-А та 118 пасаж) виявили каталазну, нітратредуктазну активність та здатність до гідролізу ТВІН-80, після пасажування через організм рисового довгоносика виявляли також активність дегідрогенази. Вихідна культура пасажу №100 не проявляла ферментативної активності, однак після перебування в організмі жуків спостерігався прояв слабкої активності дегідрогенази та нітратредуктази, що свідчить про активізацію механізмів захисту та адаптації мікобактерій в середовищі.

6. Оцінюючи життєздатність збудника виділеного довгоносиками в часі експерименту встановили, що кількість КУО в культурах нижча на 5,03-97,53% (упродовж 4-30 діб), а вірулентного штаму на 9,3-96,2%.

7. Дисоціативні форми *M. bovis* (118 пасаж) не відновлюють вірулентні властивості після проходження через організм рисового довгоносика. Пасажування вірулентного штаму (100 пасаж) через організм жуків призвело до зміни ступеня патогенності. Найбільш патогенними виявились культури, що виділені після 12-ти діб перебування в організмі довгоносика, загинув тварин відмічалась на 17,3% швидше, а індекс ураження зростав з 19 до 27 балів за схемою М.С. Триуса порівняно з вихідною культурою.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Одержані під час виконання досліджень дані можуть бути використані для написання відповідних розділів підручників, посібників, у навчальному процесі під час підготовки здобувачів вищої освіти за спеціальністю «211 Ветеринарна медицина» при викладанні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Епізоотологія та інфекційні хвороби».

2. Викладені у роботі дані щодо методики дослідження жуків можна застосовувати під час проведення діагностичних досліджень в лабораторіях ветеринарної медицини та науково-дослідних установах.

3. Дані щодо тривалості резервування комахами та виділення в зовнішнє середовище мікобактерій слід враховувати під час планування заходів діагностики, боротьби та профілактики туберкульозу в господарствах та зернових терміналів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Alifonova, K., & Zazharskyi, V. (2021). Effects of low temperature on the weight of guinea pigs. Book of Abstracts 2nd INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY CONFERENCE FOR YOUNG RESEARCHERS Sustainable Development Trends and Challenges under COVID-19. Sumy, November 29-30, p. 30-31
2. Alifonova K., & Zazharskyi V. (2022). The influence of the rice weevil on the pathogenicity of *Mycobacterium bovis*. Book of Abstracts SUSTAINABLE DEVELOPMENT IN WARTIME UKRAINE AND THE WORLD. Prague, Czech Republic, November 25, p. 8-9
3. Alves, T.D., Lara, G.H., Maluta, R.P., Ribeiro, M.G., & Leite, D.D. (2018). Carrier flies of multidrug-resistant *Escherichia coli* as potential dissemination agent in dairy farm environment. *The Science of the total environment*, 633, 1345-1351 .
4. Akinjogunla, O.J., Odeyemi, A.T., & Udoinyang, E.P. (2012). Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*): reservoirs of multi drug resistant (MDR) bacteria in Uyo, Akwa Ibom State. *Sci. J. Biol. Sci.*, 1, 19-30.
5. Argueta, C., Yoder, S., Holtzman, A. E., Aronson, T. W., Glover, N., Berlin, O. G., Stelma, G. N., Jr, Froman, S., & Tomasek, P. (2000). Isolation and identification of nontuberculous mycobacteria from foods as possible exposure sources. *Journal of food protection*, 63(7), 930–933. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.7.930>
6. Arif, S., Taj, M., Kamran, K., Iqbal, A., Taj, I., Mohammad, G., Hussain, K., & Ahmed, A. (2017). Household cockroaches of Quetta city as reservoir for infectious pathogenic bacteria. *Journal of entomology and zoology studies*, 5, 649-653.
7. Bañuls, A. L., Sanou, A., Van Anh, N. T., & Godreuil, S. (2015). *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of medical microbiology*, 64(11), 1261–1269. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000171>
8. Beerwerth, W., & Kessel, U. (1976): *Mycobacteria* in the environment of man and animal. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A*, 235, 177–183.
9. Beerwerth, W., Eysing, B., & Kessel, U. (1979). *Mykobakterien* in Arthropoden verschiedener Biotope [*Mycobacteria* in arthropodes of different biotopes (author's

transl)]. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie, 244(1), 50–57.

10. Beran, V., Havelkova, M., Kaustova, J., Dvorska, L., & Pavlik, I. (2006). Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinari Medicina*, 7(51), 365–389.

11. Bihdan, O., Parchenko, V., Zazharskyi, V., Fotina, T., & Davydenko, P. (2018). Influence Of 3-(3-Fluorophenyl)-6-(4-Methoxyphenyl)-7H-[1,2,4]-Triazolo- [3,4-B][1,3,4]Thiadiazine On The Cultural Properties Of Pathogenic Mycobacterium Bovis. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 9(6), 166-170.

12. Blagodarnyy, Ya.A., & Blehman, I.M. (1970). Ticks Argas presicus-guardians and possible vectors of tuberculosis infection in birds. *Parasitology*, 4(2), 150 – 152 [in Russian].

13. Blanc, S., Drucker, M., & Uzest, M. (2014). Localizing viruses in their insect vectors. *Annual review of phytopathology*, 52, 403–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045920>

14. Brock, Thomas D. (1988): Robert Koch. A Life in Medicine and Bacteriology: In: Scientific Revolutionaries: A Biographical Series. Science Tech. Publishers, Madison WI and J. Springer, Berlin, 364 pp., hard cover, 48 - DM. (1989). *European journal of protistology*, 25(1), 85. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(89\)80082-3](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(89)80082-3)

15. Cassidy, J. P. (2006). The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Veterinary microbiology*, 112(2-4), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.031>

16. Chandrasekhar, S., & Ratnam, S. (1992). Studies on cell-wall deficient non-acid fast variants of Mycobacterium tuberculosis. *Tubercle and lung disease the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 73(5), 273–279.

17. Clark, S., Hall, Y., & Williams, A. (2014). Animal models of tuberculosis: Guinea pigs. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(5), a018572. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018572>
18. Converse, P. J., Eisenach, K. D., Theus, S. A., Nuermberger, E. L., Tyagi, S., Ly, L. H., Geiman, D. E., Guo, H., Nolan, S. T., Akar, N. C., Klinkenberg, L. G., Gupta, R., Lun, S., Karakousis, P. C., Lamichhane, G., McMurray, D. N., Grosset, J. H., & Bishai, W. R. (2010). The impact of mouse passaging of Mycobacterium tuberculosis strains prior to virulence testing in the mouse and guinea pig aerosol models. *PloS one*, 5(4), e10289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010289>
19. Daffé, M., & Draper, P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in microbial physiology*, 39, 131–203. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60016-8](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60016-8)
20. Deb C., Lee C.M., Dubey V.S., Daniel J., Abomoelak B., Sirakova T.D., Pawar S., Rogers L. & Kolattukudy P.E. (2009) A novel in vitro multiple-stress dormancy model for Mycobacterium tuberculosis generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. *PLoS One* 29: e6077.
21. Despins, J.L., Axtell, R.C., Rives, D.V., Guy, J.S., & Ficken, M.D. (1994). Transmission of enteric pathogens of turkeys by darkling beetle larva (*Alphitobius diaperinus*). *Journal of Applied Poultry Research*. 3, 61-65.
22. Durnez, L., Eddyani, M., Mgode, G. F., Katakweba, A., Katholi, C. R., Machang'u, R. R., Kazwala, R. R., Portaels, F., & Leirs, H. (2008). First detection of mycobacteria in African rodents and insectivores, using stratified pool screening. *Applied and environmental microbiology*, 74(3), 768–773.
23. Eisenstadt, J. (1995). Microbiology and classification of mycobacteria. *Clinics in Dermatology*, 13 (3), 197-206.
24. Erfan, A., Marouf, S., & Rezk A. (2015). The role of lesser grain borer in transmission of pathogenic bacteria. *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 3(8), 306-314.

25. Faulde, M., & Spiesberger, M. (2013). Role of the moth fly *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodinae) as a mechanical vector of bacterial pathogens in German hospitals. *J Hosp Infect*, 83, 51–60.
26. Ferreira, J. D. S., Souza Oliveira, D. A., Santos, J. P., Ribeiro, C. C. D. U., Baêta, B. A., Teixeira, R. C., Neumann, A. D. S., Rosa, P. S., Pessolani, M. C. V., Moraes, M. O., Bechara, G. H., de Oliveira, P. L., Sorgine, M. H. F., Suffys, P. N., Fontes, A. N. B., Bell-Sakyi, L., Fonseca, A. H., & Lara, F. A. (2018). Ticks as potential vectors of *Mycobacterium leprae*: Use of tick cell lines to culture the bacilli and generate transgenic strains. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(12), e0007001. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007001>
27. Fischer, O. A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Peral, D. L., Weston, R. T., Bartos, M., & Pavlik, I. (2004a). Beetles as possible vectors of infections caused by *Mycobacterium avium* species. *Veterinary microbiology*, 102(3-4), 247–255.
28. Fischer, O. A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Bartl, J., Weston, R. T., & Pavlik, I. (2004b). Blowflies *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* as passive vectors of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *M. a. paratuberculosis* and *M. a. hominissuis*. *Medical and veterinary entomology*, 18(2), 116–122.
29. Fischer, O., Mátlová, L., Dvorská, L., Svástová, P., Bartl, J., Melichárek, I., Weston, R. T., & Pavlík, I. (2001). Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Medical and veterinary entomology*, 15(2), 208–211.
30. Fischer, O. A., Matlova, L., Bart, J., Dvorska, L., Melicharek, I., & Pavlik, I. (2000). Findings of mycobacteria in insectivores and small rodents. *Folia Microbiol*, 45, 147–152.
31. Fischer, O. A., Matlova, L., Bart, J., Dvorska, L., Svastova, P., du Maine, P., Melicharek, I., Bartos, M., & Pavlik, I. (2003a). Earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) and mycobacteria. *Vet. Microbiol*, 91, 325-338.
32. Fischer, O. A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., & Pavlik, I. (2003b). Nymphs of the Oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. *Medical and veterinary entomology*, 17(2), 145–150.

33. Fischer, O. A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Bartos, M., Weston, R. T., Kopečna, M., Trcka, I., & Pavlík, I. (2005). Potential risk of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis spread by syrphid flies in infected cattle farms. *Medical and veterinary entomology*, 19(4), 360–366.
34. Fischer, O. A., Mátlová, L., Dvorská, L., Svástová, P., Bartos, M., Weston, R. T., & Pavlík, I. (2006). Various stages in the life cycle of syrphid flies (*Eristalis tenax*; Diptera: Syrphidae) as potential mechanical vectors of pathogens causing mycobacterial infections in pig herds. *Folia microbiologica*, 51(2), 147–153.
35. Fisher, O. (1999). The importance of Diptera for transmission, spreading and survival of agents of some bacterial and fungal diseases in humans and animal. *Vet.Med.Czech*, 44, 133–160.
36. Foil L.D., & Gorham J.R. (2000) Mechanical Transmission of Disease Agents by Arthropods. In: Eldridge B.F., Edman J.D. (eds) *Medical Entomology*. Springer, Dordrecht.
37. Fotedar, R., Nayar, E., Samantray, J. C., Shriniwas, Banerjee, U., Dogra, V., & Kumar, A. (1989). Cockroaches as vectors of pathogenic bacteria. *The Journal of communicable diseases*, 21(4), 318–322.
38. French, A.L., Benator, D.A., & Gordin, F.M. (1997). Nontuberculous mycobacterial infections. *Med. Clin. North Amer*, 81, 361-379.
39. Fritz, C. (2002). Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific. *Infection and Immunity*, 70(1), 286–291.
40. Gao J, Guo M, Teng L, Bao R, Xian Q, Wang X & Ho W (2018) Guinea pig infected with *Mycobacterium tuberculosis* via oral consumption, *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 1323-1328, DOI: [10.1080/09712119.2018.1505622](https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1505622)
41. Goren, M. B. (2009). Mycobacterial lipids: selected topics. *Bacteriol. Revs*, 36(1) 33–36.
42. Gotsulya, A., Zazhzharskiy, V., Davidenko, P., Zazhzharskaya, N., Kulishenko, O., Panasenko, O., Gutyj, B., Pryima, O., Mazur, I., Pritsak, V., Drachuk, U., Sobolta, A., & Riy, M. (2020). Features of experimental modeling of tuberculosis in guinea pig with the participation of N'-(2-(5-((theophylline-7'-yl)methyl)-4-R-1,2,4- triazole-

3-ylthio)acetyl)isonicotinohydrazide. Ukrainian Journal of Ecology, 10(4), 191-194.
doi: 10.15421/2020_187

43. Harein, P.K., & De Las Casas, E. (1968). Bacteria from Granary Weevils Collected from Laboratory Colonies and Field Infestations. *Journal of Economic Entomology*, 61(6), 1719–1720.

44. Harein, P. K., de las Casas, E., Pomeroy, B. S., & York, M. D. (1970). Salmonella spp. and serotypes of Escherichia coli isolated from the lesser mealworm collected in poultry brooder houses. *Journal of economic entomology*, 63(1), 80–82.

45. Hayashi, D., Takii, T., Mukai, T., Makino, M., Yasuda, E., Horita, Y., Yamamoto, R., Fujiwara, A., Kanai, K., Kondo, M., Kawarazaki, A., Yano, I., Yamamoto, S., & Onozaki, K. (2010). Biochemical characteristics among Mycobacterium bovis BCG substrains. *FEMS microbiology letters*, 306(2), 103–109.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01947.x>

46. Heifets, L. (2004). Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria. *Semin. In Respir. Crit.Care Med*, 25(3), 283-295.

47. Hotsulia, A., Zazharskyi, V., Davydenko, P., Kulishenko, O., Parchenko, V., Bushuieva, I., Grynchyshyn, N., Gutyj, B., Magrelo, N., Prysyaznyuk, V., Sus, H., & Vus, U. (2021). Experimental simulation of tuberculosis and its features in rabbits under conditions of isoniazid and N'-(2-(5- ((theophylline-7-yl) methyl)-4-ethyl)-1,2,4-triazole-3- ylthio)acetyl)isonicotinohydrozide. *Ukrainian Journal of Ecology*, 11(3), 135-140, doi: 10.15421/2021_155

48. Isabel Narvaiz de Kantor, Frieden, T., Laszlo, A., Luelmo, F., Norval, P.-Y., Rieder, H., Sang Jae Kim, Valenzuela, P., & Weyer, K. (1998). Лабораторная служба в программах борьбы с туберкулезом. Ч. 3 : Культуральное исследование. Всемирная организация здравоохранения, Минск, 95.

49. Jackson S.K., Stark J.M., Taylor S. & Harwood J.L. (1989) Changes in phospholipid fatty acid composition and triacylglycerol content in mouse tissues after infection with bacille CalmetteGuerin. ´ *Brit J Exp Pathol* 70: 435–441.

50. Jalil, N., Keyhani, A., Hasan, M.K., Mahdi, M., Monireh, M, & Atefeh. B. (2012). Cockroaches' bacterial infections in wards of hospitals, Hamedan city, west of Iran. *Asian Pac J Trop Dis*, 2(5), 381–384.
51. Jelińska, A., Zając, M., Dadej, A., Tomczak, S., Geszke-Moritz, M., & Muszalska-Kolos, I. (2020). Tuberculosis - Present Medication and Therapeutic Prospects. *Current medicinal chemistry*, 27(4), 630–656. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181120100025>
52. Kam, K. M., Yip, C. W., Tse, L. W., Leung, K. L., Wong, K. L., Ko, W. M., & Wong, W. S. (2006). Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Beijing family: Optimized VNTR typing of *M. tuberculosis* Beijing family. *FEMS Microbiology Letters*, 256(2), 258–265. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00126.x>
53. Kappel, H. B., Oliveira, A. G., Silva, P. R., & Pelli, A. (2013). Non-biting flying insects as carriers of pathogenic bacteria in a Brazilian hospital. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(2), 234–236.
54. Karami, M., Pournajaf, A., Rajabnia, R., Omran, S.M., Heidarpour, A.R., Alipour, J., Khademian, A., & Armaki, M.T. (2020). Isolation of important cultivable bacteria from the moth flies (*Clogmia albipunctata*) as a mechanical vector in Babol Hospitals, north of Iran. *Allied Journal of Medical Research* , 4(1), 40-43.
55. Kashino, S. S., Napolitano, D. R., Skobe, Z., & Campos-Neto, A. (2008). Guinea pig model of *Mycobacterium tuberculosis* latent/dormant infection. *Microbes and infection*, 10(14-15), 1469–1476. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.08.010>
56. Kassiri, H., & Kazemi, S. (2012). Cockroaches [*Periplaneta americana* (L.), Dictyoptera; Blattidae] as Carriers of Bacterial Pathogens, Khorramshahr County, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 5. 320-322.
57. Katoch V. M. (2004). Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *The Indian journal of medical research*, 120(4), 290–304.
58. Kazda J. (2000) The Possible convergence towards pathogenicity in environmentally-derived mycobacteria. In: *The Ecology of Mycobacteria*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4102-4_6

59. Khol, J.L., Beran, V., Kralik, P., Trckova, M., Pavlik, I., & Baumgartner, W. (2010). Grass silage contaminated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP): a possible source of paratuberculosis infection in ruminants? *Veterinární medicína*, 55(5), 225-232. doi: 10.17221/2996-VETMED
60. Kopanic, R. J., Jr, Sheldon, B. W., & Wright, C. G. (1994). Cockroaches As Vectors of Salmonella: Laboratory and Field Trials. *Journal of food protection*, 57(2), 125–135.
61. Laukaitis, H. J., & Macaluso, K. R. (2021). Unpacking the intricacies of Rickettsia-vector interactions. *Trends in parasitology*, 37(8), 734–746. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.05.008>
62. Li, Z., Kelley, C., Collins, F., Rouse, D., & Morris, S. (1998). Expression of katG in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs. *The Journal of infectious diseases*, 177(4), 1030–1035. <https://doi.org/10.1086/515254>
63. Ma, E., Zhu, Y., Liu, Z., Wei, T., Wang, P., & Cheng, G. (2021). Interaction of Viruses with the Insect Intestine. *Annual review of virology*, 8(1), 115–131. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-100543>
64. Malik, K., Jamil, A., & Arshad, A. (2013). Study of pathogenic microorganisms in the external body parts of American cockroach (*Periplaneta americana*) collected from different kitchens. *IOSR journal of pharmacy and biological sciences*, 7(6), 45–48.
65. Manca, C., Paul, S., Barry, C. E., Freedman, V. H., & Kaplan, A. (1998). *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infection and Immunity*, 67(1), 74–79.
66. Markova, N., Slavchev, G., & Michailova, L. (2015). Presence of mycobacterial L-forms in human blood: Challenge of BCG vaccination. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 11(5), 1192–1200. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1016682>
67. Marsollier, L., Robert, R., Aubry, J., Saint André, J. P., Kouakou, H., Legras, P., Manceau, A. L., Mahaza, C., & Carbonnelle, B. (2002). Aquatic insects as a vector

for *Mycobacterium ulcerans*. *Applied and environmental microbiology*, 68(9), 4623–4628. <https://doi.org/10.1128/aem.68.9.4623-4628.2002>

68. Matlova, L., Dvorska, L., Bartl, J., Bartos, M., Ayele, W.Y., Alexa, M., & Pavlik, I. (2003). *Mycobacteria* isolated from the environment of pig farms in the Czech Republic during the years 1996 to 2002. *Veterinární medicína*, 48(12), 343-357. doi: 10.17221/5789-VETMED

69. Memon, H., Manzoor, F., & Anjum, A. A. (2017). Cockroaches (Blattodea: Blattidae): A Reservoir of Pathogenic Microbes in Human-Dwelling Localities in Lahore. *Journal of Medical Entomology*, 54(2), 435-440. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw168>

70. Moges, F., Eshetie, S., Endris, M., Huruy, K., Muluye, D., Feleke, T., G/Silassie, F., Ayalew, G., & Nagappan, R. (2016). Cockroaches as a Source of High Bacterial Pathogens with Multidrug Resistant Strains in Gondar Town, Ethiopia. *BioMed research international*, 1-6.

71. Nagham, Y.A., Anfal, S.A., & Israa, K.A. (2011). Risks associated with cockroach *Periplaneta americana* as a transmitter of pathogen agents. *Diyala Journal of Medicine*. 1(1), 91–97.

72. Nassau, E., Parsons, E. R., & Johnson, G. D. (1976). The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle*, 57(1), 67–70.

73. Nha Yen, H.N., Phuong Chau, D.N., Hong Phien, H., Tron, B.V., Van Ngon, N., Be Nam, T.V., Thuan, N.H., & Thanh Men, T. (2022). New Records of an Insect Species from Decomposed Animal Feces that Carry Pathogenic Bacteria on Human. *International Journal of Pathogen Research*.

74. Nwankwo, Emmanuel & Onusiriuka, Kelechi & Elesho, B & Okechukwu, Pipi. (2016). Isolation and Identification of Some Microbial Pathogens Associated with the External Body Surface of *Periplaneta americana* in Umuahia, Abia State. *International Journal of TROPICAL DISEASE & Health*. 13. 1-8. <https://doi.org/10.9734/IJTDH/2016/22891>

75. Palchykov V.A., Zazharskyi V.V., Brygadyrenko V.V., Davydenko P.O., Kulishenko O.M., Borovik I.V., Chumak V., Kryvaya A., & Boyko O.O. (2019). Bactericidal, protistocidal, nematocidal properties and chemical composition of ethanol extract of punica granatum peel. *Biosystems Diversity*, 27 (3), 300-306.
76. Palomar, A. M., Premchand-Branker, S., Alberdi, P., Belova, O. A., Moniuszko-Malinowska, A., Kahl, O., & Bell-Sakyi, L. (2019). Isolation of known and potentially pathogenic tick-borne microorganisms from European ixodid ticks using tick cell lines. *Ticks and tick-borne diseases*, 10(3), 628–638. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.008>
77. Portaels, F., Elsen, P., Guimaraes-Peres, A., Fonteyne, P. A., & Meyers, W. M. (1999). Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet (London, England)*, 353(9157), 986. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)05177-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)05177-0)
78. Portaels, F., Chemlal, K., Elsen, P., Johnson, P. D., Hayman, J. A., Hibble, J., Kirkwood, R., & Meyers, W. M. (2001). *Mycobacterium ulcerans* in wild animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), 252–264. <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1270>
79. Roberts, G.D, & Thompson, G.P. (1994). Bacteriology and bacteriologic diagnosis of tuberculosis. in: D Schlossberg (Ed.) *Tuberculosis*. 3rd ed. Springer-Verlag, Berlin/New York.
80. Sarwar, M.H. (2015). Insect Vectors Involving in Mechanical Transmission of Human Pathogens for Serious Diseases. *International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering*, 1(3), 300-306
81. Skuce, R. A., Allen, A. R., & McDowell, S. W. (2012). Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. *Veterinary medicine international*, 2012, 621210.
82. Smeulders, M. J., Keer, J., Speight, R. A., & Williams, H. D. (1999). Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *Journal of bacteriology*, 181(1), 270–283. <https://doi.org/10.1128/JB.181.1.270-283.1999>

83. Sohaskey, C. (2008) Nitrate enhances the survival of *Mycobacterium tuberculosis* during inhibition of respiration. *J Bacteriol* 190, 2981–2986
84. Sohaskey, C. D., & Modesti, L. (2009). Differences in nitrate reduction between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* are due to differential expression of both *narGHJI* and *narK2*. *FEMS microbiology letters*, 290(2), 129–134. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01424.x>
85. Rozales, F. P., Machado, A. B., De Paris, F., Zavascki, A. P., & Barth, A. L. (2014). PCR to detect *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory tract samples: evaluation of clinical data. *Epidemiology and infection*, 142(7), 1517–1523. <https://doi.org/10.1017/S0950268813002598>
86. Runyon E. H. (1959). Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *The Medical clinics of North America*, 43(1), 273–290.
87. Sramova, H., Daniel, M., Absolonova, V., Dedicova, D., Jedlickova, Z., Lhotova, H., Petras, P., Subertova, V. (1992). Epidemiological role of arthropods detectable in health facilities. *J Hosp Infec*, 20, 281–292.
88. Tkachenko, O., Kozak, N., Bilan, M., Hlebeniuk, V., Alekseeva, N., Kovaleva, L., Nedosekov, V., & Galatiuk, O. (2021). The Effect of Long-Term Storage on *Mycobacterium bovis*. *Polish journal of microbiology*, 70(3), 327–337. <https://doi.org/10.33073/pjm-2021-031>
89. Tkachenko O, Bilan M, Hlebeniuk V, Kozak N, Nedosekov V, & Galatiuk O. (2020). Dissociation of *Mycobacterium bovis*: Morphology, biological properties and lipids. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 8(3): 312-326. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.3.317.326>
90. Tkachenko, O., Alifonova, K., Gavrylina, O., & Knight, A. (2021a). Epizootological significance of rice weevil as a *Mycobacterium bovis* reservoir. *Scientific Horizons*, 24(3), 28-37. [https://doi.org/10.48077/scihor.24\(3\).2021.28-37](https://doi.org/10.48077/scihor.24(3).2021.28-37)
91. Tاتفeng, Y. M., Usuanlele, M. U., Orukpe, A., Digban, A. K., Okodua, M., Oviasogie, F., & Turay, A. A. (2005). Mechanical transmission of pathogenic organisms: the role of cockroaches. *Journal of vector borne diseases*, 42(4), 129–134.

92. Timpe, A., & Runyon, E. H. (1954). The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 44(2), 202–209.
93. Tongluan, N., Shelton, L. T., Collins, J. H., Ingraffia, P., McCormick, G., Pena, M., Sharma, R., Lahiri, R., Adams, L. B., Truman, R. W., & Macaluso, K. R. (2021). Mycobacterium leprae Infection in Ticks and Tick-Derived Cells. *Frontiers in microbiology*, 12, 761420. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.761420>
94. Tsuramura, M. A. (1973). Taxonomic study of strains received as “Mycobacterium” rhodochrous. *Jap. Z. Microbiol.*, 17(4), 189-197.
95. Van Boxtel, R. M., Lambrecht, R. S., & Collins, M. T. (1990). Effects of colonial morphology and tween 80 on antimicrobial susceptibility of Mycobacterium paratuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(12), 2300–2303. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.12.2300>
96. Vázquez-Marrufo, G., Marín-Hernández, D., Zavala-Páramo, M. G., Vázquez-Narvaez, G., Álvarez-Aguilar, C., & Vázquez-Garcidueñas, M. S. (2008). Genetic diversity among Mycobacterium tuberculosis isolates from Mexican patients. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(8), 610–618. <https://doi.org/10.1139/W08-051>
97. Wallace, J.R., Gordon, M.C., Hartsell, L., Mosi, L., Benbow, M.E., Merritt, R.W., & Small P.L. (2010). Interaction of Mycobacterium ulcerans with mosquito species: implications for transmission and trophic relationship. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6215-6222.
98. Wayne, L.G., and Kubica, G.P. (1986) Mycobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. P.A.H. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds). Baltimore, MD: The Williams & Wilkins Co., pp. 1436– 1457.
99. Weber, I., Fritz, C., Ruttkowski, S., Kreft, A., & Bange, F. (2000). Anaerobic nitrate reductase (narGHJI) activity of Mycobacterium bovis BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice. *Mol Microbiol* 35: 1017–1025.
100. Wolinsky, E. (1992). Mycobacterial diseases other than tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, 15, 1-12.

101. Zakladnoy, G.A. (2018). Effect of Grain Infestation with the Rice Weevil *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, Dryophthoridae) on the Quality of Grain and Grain Products. *Entomological Review*, 98, 659-662.
102. Zarei, O., Shokoohizadeh, L., Hossainpour, H., & Alikhani, M.Y. (2018). Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical, environmental and cockroach sources by ERIC-PCR. *BMC Res Notes* 11 (1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3765-z>
103. Zazharskyi, V., Parchenko, M., Fotina, T., Davydenko, P., Kulishenko, O., Zazharskaya, N., & Borovik, I. (2019). Synthesis, structure, physicochemical properties and antibacterial activity of 1,2,4-triazoles-3-thiols and furan derivatives. *Voprosy Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii*, 6, 74–82.
104. Zazharskyi V.V., Davydenko P., Kulishenko O., Borovik I.V., Zazharska N.M., & Brygadyrenko V.V. (2020). Antibacterial and fungicidal activities of ethanol extracts of 38 species of plants. *Biosystems Diversity*, 28 (3), 281-289.
105. Zazharskyi, V., Alifonova, K., Bilan, M., Kozak, N., & Kasianenko, O. (2022). Influence of *Sitophilus oryzae* on biological properties of *Mycobacterium bovis*. *Scientific Horizons*, 25(11), 20-30. [https://doi.org/10.48077/scihor.25\(11\).2022.20-30](https://doi.org/10.48077/scihor.25(11).2022.20-30)
106. Zazharskyi, V. V., Alifonova, K. V., Brygadyrenko, V. V., Zazharska, N. M., Goncharenko, V. P., Solomon, V. V. (2023). The ability of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae) to transmit *Mycobacterium bovis*: Morphology, cultural biochemical properties of the bacteria. *Regul. Mech. Biosyst.*, 2023, 14(3), 511-523.
107. Zink, A., Haas, C. J., Reischl, U., Szeimies, U., & Nerlich, A. G. (2001). Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. *Journal of Medical Microbiology*, 50(4), 355–366. doi:10.1099/0022-1317-50-4-355
108. Аліфонова К. В. (2021). Комахи – чинник передачі мікобактерій туберкульозу (оглядова стаття). *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*, 7, 7-11. <https://doi.org/10.31890/vttp.2021.07.01>
109. Аліфонова, К. В. (2020). Жуки – резервуар мікобактерій туберкульозу. *Матеріали II міжнародної науково-практичної конференції*

«Теоретичні та практичні аспекти розвитку науки та освіти» Львів, 15-16 вересня 2020 року, С. 5-6

110. Аліфонова, К. В. (2021). Роль комах у процесі поширення мікобактерій. Збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції «Проблеми та перспективи розвитку науки, освіти та суспільства в ХХІ столітті» Полтава, 23 вересня 2021 року, С. 48-49

111. Аліфонова К.В., & Зажарський В.В. (2023). Науково-практичні рекомендації. Методика експериментального інфікування комах збудником туберкульозу. Дніпро, 27.

112. Атамась, В. Я. (2008). Сучасні проблеми епізоотології. Аграрний вісник Причорномор'я, збірник наукових праць, 42 (2), 4-7.

113. Березовський, І. В. (2005). Виявлення мікобактерій туберкульозу різними методами. Науковий вісник Львівського нац. ун-ту вет.медицини ім. С. З. Гжицького, Львів, 7 (1), 8–11.

114. Білан, М. В., Ткаченко, О. А., Ковальова, Л. О. (2007). Вільні жирні кислоти – фактори патогенності *M. bovis*. Вет. науки.: зб. наук. праць Луган. НАУ, присвячений 10-річчю заснування факультету вет. Медицини, 78(101), 613 – 620.

115. Бондарев, И. М., Гулевская, С. А., Немсадзе, М. Н., & Михайлов, И.М. (1976). Морфология начальных этапов L-трансформации микобактерий туберкулеза при сканирующей электронной микроскопии. Проблемы туберкулеза, 12, 55–61.

116. Бондаренко, І. В. (2015а). Видове різноманіття членистоногих-шкідників зерна колосових культур в період зберігання. Збірник наукових праць Національного наукового центру "Інститут землеробства НААН", 3, 69-76.

117. Бондаренко, І. В. (2015б). Порівняльна ефективність методів обліку членистоногих-шкідників запасів зерна. Луб'янні та технічні культури, 4, 110-118.

118. Вейсфейлер, Ю.К. (1975). Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерии. Будапешт: Изд-во АН Венгрии, 336.
119. Гайда, А.И. (2015). Неотложные мероприятия по предупреждению распространения туберкулеза легких с широкой лекарственной устойчивостью микобактерий в Архангельской области. дисс. ... канд. вет. наук/ А. И. Гайда. – Архангельск.
120. Глебенюк, В. В. (2007). Особливості культивування *M. bovis* швидкорослого штаму за різних температур. Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини: Зб. наук. праць Харківської державної академії. Харків, 53-57.
121. Гусев, В. І., Єрмоленко, В. М., Свищук, В. В., & Шмиговський, К. А. (1962). Атлас комах України. Київ: Рад. шк., 304.
122. Головка, В. О., Кассіч, О. В., Кассіч, В. Ю., & Левченко, А. Г. (2016). Збудники туберкульозу і атипові мікобактерії, їх ультраструктура, диференціація та епізоотологічне значення. Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини: збірник наукових праць, Харків, 33 (2), 95–101.
123. Горальський Л. П., Хомич В. Т., Кононський О. І. (2019). Основи гістологічної техніки та морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. Навчальний посібник. Житомир, 286 с.
124. Горжеєв В. М. (2014). Туберкульоз тварин: науково-практичні аспекти боротьби та профілактики в Україні. Ветеринарна медицина України, 8, 13-15.
125. Горщар, О.А., Педаш, Т.М., & Горщар, В.І. (2016). Виявлення шкідливих організмів у запасах зерна та визначення максимальної кратності їх обробок препаратами широкого використання. Бюлетень інституту сільського господарства степової зони НААН України, 10, 97-101.
126. Завгородній А І., Стегній, Б.Т., & Бісюк, І.Ю. (2014а). Система епізоотологічного моніторингу, діагностики, профілактики та оздоровлення тваринництва України від туберкульозу. Ветеринарна медицина України, 1, 10-13.

127. Завгородній А.І., Палій, А.П., Стегній, Б.Т., & Калашник, М.В. (2014б). Біологічні властивості L-форм мікобактерій, виділених із біоматеріалу. *Ветеринарна медицина України*, 11, 9-12.
128. Завгородній, А. І., & Котляр, О. В. (2014в). Вивчення культурально-морфологічних і біологічних властивостей атипичних мікобактерій, виділених від великої рогатої худоби в господарствах України. *Ветеринарна медицина*, 98 (6), 124–127.
129. Зажарський, В. В., & Аліфонова, К. В. (2022). Особливості інфікування жуків мікобактеріями та їх вплив на життєздатність збудника. *Scientific Progress & Innovations*, 2(2), 248-255. <https://doi.org/10.31210/visnyk2022.02.29>
130. Зелінський, М. (2000). Туберкульоз великої рогатої худоби. Причини виникнення та фактори, що стримують оздоровлення не благополучних господарств. *Ветеринарна медицина України*, 6, 15-16.
131. Калашник, М. Д. (2016а). Дослідження патологічного матеріалу від лабораторних тварин на туберкульоз. *Вісн. Сум. нац. аграр. ун-ту. Сер.: Вет. Медицина*, 6(38), 137–141.
132. Калашник, М. Д. (2016б). Дослідження біологічного матеріалу від великої рогатої худоби культуральним методом на туберкульоз. *Вет. медицина: міжвідом. темат. наук. зб. Харків*, 102, 91–94.
133. Кассіч, Ю., Завгородній, А., Кассіч, В., Вербицький, П., Горжеєв, В., Кучерявенко, О., Льоля, В., Яковлев, В., & Негипа, С. (2001). Визначення природи реакцій на туберкулін у великої рогатої худоби шляхом застосування симультанної алергічної проби. *Ветеринарна медицина України*, 5, 14-15.
134. Кассич, Ю. Я., Завгородний, А. И., & Кассич, В. Ю. (2004). Симультанная аллергическая проба при диагностике туберкулеза. *Ветеринария*, 8, 16–18.
135. Кассіч, Ю. Я., Кассіч, Ю. Я., Завгородній, А. І., Льоля, В. В., Заїка, О. І., Гриненко, А. В., Принцевський, С. Д., Яковлев, В. Я., Шершень, П. О., & Кассич, В. Ю. Якої шкоди завдають мікобактерії тваринництву

Харківщини?. Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Зб. наук. Праць присвячений 150-річчю від заснування ХЗВІ, Харків, 9(33),73–78.

136. Кассіч, В. Ю. (2004). Мінливість мікобактерій, епізоотологічний моніторинг, заходи і засоби боротьби з туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу. дис. ... док. вет. наук/В. Ю.Кассіч. – Харків.

137. Кассіч, Ю. Я., Завгородній, А., Льоля, В., Негипа, С., Горжесєв, В, Кучерявенко, О., Онищенко, П., Наумчук, В., Яковлев, В., Макаров, В., Рябуха, В., Кассіч, В. (2003). Застосування симультанної алергічної проби для визначення природи реакцій на туберкулін у поодиноких тварин великої рогатої худоби, благополучної щодо захворювання на туберкульоз. Вет. медицина України, 1, 17–18.

138. Кассіч В.Ю. Мінливість мікобактерій, епізоотологічний моніторинг, заходи і засоби боротьби з _туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу: Автореф. дис...д.вет.н.: 16.00.03. - Харків, 2004. - 42 с.

139. Кассіч, В. Ю, Камбур, М. Д., Фотін, А. І., Ребенко, Г. І., Байдевятов, Ю. А., Волосянко, О. В., Ушкалов, В. О., Атамась, В. Я., & Фотін, О. В. (2014). Проблеми сучасної епізоотології. Ветеринарна медицина, Вісник Сумського національного аграрного університету, 1(34), 110–114.

140. Кассіч, О. В. Левченко, А. Г., Кассіч, В. Ю. (2017). Алергічні дослідження на туберкульоз великої рогатої худоби та мурчаків з використанням препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений» Вісник Сумського НАУ, «Ветеринарна медицина», 1(42), 276–281.

141. Кассич, Ю.Я., Кассич, А.Т., Борзяк, А.Т., & Кочмаровский, А.Ф. (1990). Туберкулез животных и меры борьбы с ним. Киев: Урожай, 304.

142. Каришева, А.Ф. (2002). Спеціальна епізоотологія. К.: Вища освіта, 703.

143. Кулішенко, О. М., Давиденко, П. О., Зажарський, В. В., & Ткаченко, О. А. (2015). Морфологія та культуральні властивості дисоціативних форм *Mycobacterium bovis*, культивованих за 3 та 37° С. Житомирський національний агроєкологічний університет, Т. 3, 1(49), 88–94.

144. Ляхович, Л. М., Щетинський, І. М., Захар'єв, А. В., Ульяницька, А. Ю., Мартєм'янова, А. Є., & Ткачова, К. В. (2018). Туберкульоз фазанів та павичів: аспекти танатогенезу Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування, 2, 56-58.
145. Манченко, В.М., Троценко, З.Р., & Павленко, М.С. (1994). Настанова по діагностиці туберкульозу. Київ, 39.
146. Мельник, С.І., Муляр, О.Д., Кочубей, М.Й., & Іванцов, П.Д. (2010). Технологія виробництва продукції рослинництва : навч. посіб. Ч.1. К., Аграрна освіта, 282.
147. Романенко, В.П. (2013). Епізоотолого–епідеміологічні властивості мікобактерій туберкульозу. Ветеринарна медицина, 97, 224-226.
148. Романенко, В.П. (2012). Епідеміолого-епізоотологічні властивості мікобактерій туберкульозу. Вісник аграрної науки, 12, 29-32.
149. Романенко, В.Ф., Козлов, В.С., & Дяченко, А.М. (1995). Адаптивная изменчивость возбудителя туберкулеза человеческого и птичьего видов в организме крупного рогатого скота. Ветеринария, 12, 22–26.
150. Романенко, В.П., Козлов, В.С., & Дяченко, А.М. (1997а). Адаптивна мінливість мікобактерій туберкульозу. Вет. медицина України, 9, 12–13.
151. Романенко, В.Ф., Дяченко, А.М., Кравченко, Н.А., & Мыкытин, О.О. (2003). Изменчивость видов микобактерий туберкулеза при адаптации к организму животных. Міжвід. темат. наук. зб, 82, 486–492.
152. Романенко, В.Ф., Козлов, В.С., Дяченко, А.М., & Матузенко, В.А. (1997б). Изменчивость возбудителя туберкулеза в организме несвойственного хозяина. Ветеринария, 1, 20–24.
153. Романенко, В.П., Кравченко, Н.О., Вербицький, П.І., & Дяченко, А.М. (2002). Трансоваріальна передача збудників туберкульозу ссавців, адаптованих до організму курей, та їх порівняльна характеристика. Вет. медицина України, 10, 12–14.
154. Ротов, В.И. (1978). Туберкулез сельскохозяйственных животных. К.: Урожай, 61.

155. Стегній, Б.Т, Завгородній, А.І., & Загребельний, В.О. (2012). Стан і перспективи вирішення проблеми туберкульозу тварин в Україні. Ветеринарна медицина: Міжвід. темат. наук. зб., 96, 237–239.
156. Стегній, Б.Т., Герілович, А.П., Лиманська, О.Ю., Болотін, В.І., Скрипник, А.В., Сапко, С.А., & Анічин, Р.Ю. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини. УААН, ННЦ ІЕКВМ, 108.
157. Ткаченко, О.А. (1998). Усовершенствование питательной среды Левенштейна-Йенсена для культивирования микобактерий. Вет. мед. Украины, 8, 19.
158. Ткаченко, О. А., Зажарський, В. В., Алексєєва, Н. В., Ковальов, А. В., & Зелінський, М. Д. (2013). Економічні збитки від туберкульозу великої рогатої худоби. Ветеринарна медицина України, Ветінформ, 1, 6-10.
159. Ткаченко, О.А. (2017). Мінливість *Mycobacterium bovis*: монографія. Житомир: Полісся, 396 с.
160. Ткаченко, О. А. (1999). Проблема атипів мікобактерій і зумовленої ними мікобактеріозної інфекції. Ветеринарна медицина України, Ветінформ, 3, 26-27.
161. Ткаченко, О.А. (1998). Туберкульоз і атипів мікобактерій в епізоотичному процесі (епізоотологічні та експериментальні дані). дисс. ... д-ра. вет. наук/О.А.Ткаченко. – Дніпропетровськ.
162. Ткаченко, О. А., Білан, М. В., Зажарський, В. В., & Ковальова, Л. О. (2010). Лабораторна діагностика туберкульозу тварин. Видавництво Свідлер, Дніпропетровськ, 208.
163. Тодорико, Л.Д., & Шевченко, О.С. (2016). Современные аспекты легочного микобактериоза (аналитический обзор). Актуальная инфектология, 4 (13), 13-21.
164. Фещенко, Ю.І., Мельник, В.М. (2004). Сучасні методи діагностики, лікування і профілактики туберкульозу. Київ, Здоров'я, 904.
165. Финн, Р.Э. (1973). Пути повышения высеваемости и ускорения роста микобактерий туберкулеза в современных условиях их изменчивости: Автореф.

дисс. на соискание ученой степени канди-дата медицинских наук. – Кишинев, 1973.

166. Черних, С. А., Грекова, Н. В., & Чурсінов, Ю. О. (2016). Особливості зберігання зернових запасів з використанням охолодження та моніторинг комірних шкідників. Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету, 1, 68-72.

167. Чернушенко, К.Ф., Журило, О.А., Клименко, М.Т., Барбова, А.І., Ясир, С.Г., В'ялих, Ж.Е., & Трофімова, П.С. (2002). Біологічні особливості L-форм мікобактерій туберкульозу, що виділені у хворих на туберкульоз легень. Укр. пульмолог. Журнал, 2, 48-51.

168. Чурсінов, Ю.О., Черних, С.А., & Кошулько, В.С. (2009). Системи та засоби захисту зернових запасів: навч. посібник. Дніпропетровськ: ДДАУ, 313.

169. Шевченко, О.С., Тодорико, Л.Д., Потейко, П.И., & Погорелова, О.А. (2019). Вопросы диагностики и лечения нетуберкулезных микобактериозов. Східноєвропейський журнал внутрішньої та сімейної медицини, 1, 36–53.

170. Шендрик, І. М. (2016). Роль личинок *strongyloides papillosus* в інфекційному процесі туберкульозу (в експерименті на мурчаках) . дис.... к-та. вет. наук/І.М. Шендрик.–Дніпропетровськ.

171. Шкуратова, И.А., Порываева, А. П., Красноперов, А. С., & Малков, С. В. (2018). Диагностические исследования при антропозоонозных инфекциях (на примере туберкулеза крупного рогатого скота). БИО, 2, 22-25.

172. Яворська, Г.В., & Сибірна, Р.І. (2009). Морфолого-культуральні і фізіолого-біохімічні властивості атипичних мікобактерій. Мікробіологічний журнал, 71(4), 27-34.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

1. Наукові праці, в яких опубліковано основні результати дисертації:

1.1. Статті у фахових виданнях України:

1. **Аліфонова К. В.** (2021). Комахи – чинник передачі мікобактерій туберкульозу (оглядова стаття). Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування, 7, 7-11. <https://doi.org/10.31890/vttp.2021.07.01>

2. Зажарський, В. В., & **Аліфонова, К. В.** (2022). Особливості інфікування жуків мікобактеріями та їх вплив на життєздатність збудника. Scientific Progress & Innovations, 2(2), 248-255. <https://doi.org/10.31210/visnyk2022.02.29>

1.2. Статті у наукових виданнях, включених до наукометричних баз даних Web of Science, Scopus

3. Tkachenko, O., **Alifonova, K.**, Gavrylina, O., & Knight, A. (2021a). Epizootological significance of rice weevil as a *Mycobacterium bovis* reservoir. Scientific Horizons, 24(3), 28-37. [https://doi.org/10.48077/scihor.24\(3\).2021.28-37](https://doi.org/10.48077/scihor.24(3).2021.28-37) Q4

4. Zazharskyi, V., **Alifonova, K.**, Bilan, M., Kozak, N., & Kasianenko, O. (2022). Influence of *Sitophilus oryzae* on biological properties of *Mycobacterium bovis*. Scientific Horizons, 25(11), 20-30. [https://doi.org/10.48077/scihor.25\(11\).2022.20-30](https://doi.org/10.48077/scihor.25(11).2022.20-30) Q4

5. Zazharskyi, V. V., **Alifonova, K. V.**, Brygadyrenko, V. V., Zazharska, N. M., Goncharenko, V. P., Solomon, V. V. (2023). The ability of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae) to transmit *Mycobacterium bovis*: Morphology, cultural biochemical properties of the bacteria. Regul. Mech. Biosyst., 2023, 14(3), 511-523.

2. Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. **Аліфонова, К. В.** (2020). Жуки – резервуар мікобактерій туберкульозу. Матеріали II міжнародної науково-практичної конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку науки та освіти» Львів, 15-16 вересня 2020 року, С. 5-6

7. **Аліфонова, К. В.** (2021). Роль комах у процесі поширення мікобактерій. Збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції «Проблеми та перспективи розвитку науки, освіти та суспільства в XXI столітті» Полтава, 23 вересня 2021 року, С. 48-49

8. **Kira Alifonova, & Volodymyr Zazharskyi** (2021). Effects of low temperature on the weight of guinea pigs. Book of Abstracts 2nd INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY CONFERENCE FOR YOUNG RESEARCHERS Sustainable Development Trends and Challenges under COVID-19. Sumy, November 29-30, p. 30-31

9. **Alifonova K., & Zazharskyi V.** (2022). The influence of the rice weevil on the pathogenicity of *Mycobacterium bovis*. Book of Abstracts SUSTAINABLE DEVELOPMENT IN WARTIME UKRAINE AND THE WORLD. Prague, Czech Republic, November 25, p. 8-9

2. 1. Науково-практичні рекомендації:

10. **Аліфонова К.В., & Зажарський В.В.** (2023). Науково-практичні рекомендації. Методика експериментального інфікування комах збудником туберкульозу. Дніпро, 27

ДОДАТОК Б







Certificate of Participation

Kira Alifonova

(Topic: Effects of low temperature on the weight of guinea pigs)

has attended a 2-days conference:

“ 2nd Multidisciplinary Conference for Young Researchers - Sustainable Development Trends and Challenges under COVID-19”

organized in the framework of the development project:

“ Interuniversity Cooperation as a Tool For Enhancement of Quality of Selected Universities in Ukraine ”

Head of Scientific Committee and guarantor: Assoc. Prof. Dr. Hynek Roubík
Czech University of Life Sciences Prague

Project Coordinator: Ing. Jana Hvodzovicova, Ph.D.
Czech University of Life Sciences Prague

Sumy, 29-30 November 2021



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАУКОВО-МЕТОДИЧНИЙ ЦЕНТР ВИЩОЇ ТА ФАХОВОЇ ПЕРЕДВИЩОЇ ОСВІТИ

СЕРТИФІКАТ

СС 38282994/0624-22

ВИДАНИЙ

КІРІ АЛІФОНОВІЙ

в тому, що вона 9 лютого 2022 року взяла участь у вебінарі
«Створення унікальних мікропопуляцій молочної худоби»

Форма навчання – дистанційна

Тривалість навчання – 2 годин



Директор



Тетяна ІЩЕНКО

9 лютого 2022 року
м. Київ

Ліцензія: наказ МОН України від 15.09.2021 № 171-л (протокол № 225)



Certificate of Participation

Kira Alifonova

has attended a 90 hours virtual course on the topic:
„English Academic Writing”
 organized in the framework of the development project
“ENHANCEMENT OF THE PHD STUDENTS POTENTIAL FOR QUALITATIVE RESEARCH IN UKRAINE ”

Guaranteed by:

Prof. Ing. David Herák, PhD
 Vice Dean for International Relations, Faculty of Engineering
Assoc. Prof. Ing. Abraham Kabutey, PhD
 Department of Mechanical Engineering, Faculty of Engineering

Czech University of Life Sciences Prague,
 September, 2022



Certificate of Participation

Kira Alifonova

(DOB 17.01.1995, Dnipro State Agrarian and Economic University, alifonova.k.v@dsan.dp.ua)

has attended a 90 hours summer school on design of the qualitative research proposals for grants
 funding organized in the framework of the development project
“ENHANCEMENT OF THE PHD STUDENTS POTENTIAL FOR QUALITATIVE RESEARCH IN UKRAINE ”

held in Prague, Czech Republic, at the Faculty of Engineering, Czech University
 of Life Sciences Prague, from October 17th 2022, until October 21st 2022.

Prof. Ing. David Herák, Ph.D.
 Vice Dean for International Relations
 Faculty of Engineering
 CZU

In Prague, 21. 10. 2022
Assoc. prof. Ing. Abraham Kabutey, Ph.D.
 Department of Mechanical Engineering
 Faculty of Engineering
 CZU



СЕРТИФІКАТ

засвідчує, що

Кіра Володимирівна Аліфонова

є автором кращої наукової статті

**«Епізоотологічне значення рисового довгоноса
як резервуара *Mycobacterium bovis*»**

останнього опублікованого номера (Том 24, № 3)
журналу **«Наукові горизонти»**




Пилипенко Сергій Васильович
CEO Видавничого дому "Наукові Журнали"



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ



СЕРТИФІКАТ

засвідчує, що

КІРА АЛІФОНОВА

взяла участь у Міжнародній науково-практичній конференції науково-педагогічних працівників та молодих науковців

**«АКТУАЛЬНІ АСПЕКТИ РОЗВИТКУ ВЕТЕРИНАРНОЇ
МЕДИЦИНИ В УМОВАХ ЄВРОІНТЕГРАЦІЇ»,**

присвяченої 85-річчю заснування факультету ветеринарної медицини ОДАУ

Декан факультету
ветеринарної медицини



Катерина РОДІОНОВА

85-річчя заснування факультету ветеринарної медицини ОДАУ

85-річчя заснування факультету ветеринарної медицини ОДАУ

ДОДАТОК В

Культуральні властивості дослідних культур та отриманих субкультур

Показник	Температура культивування	Пасаж №117-а		Пасаж №118		Пасаж №100	
		Вихідна культура	Субкультура	Вихідна культура	Субкультура	Вихідна культура	Субкультура
Наявність росту	3,0±0,5	+	+	+	+	+	-
	37,0±0,5	+	+	+	+	+	+
Характер росту	3,0±0,5	С.р.	С.р.	С.р.	Окремі колонії	Окремі колонії	-
	37,0±0,5	С.р.	С.р.	С.р.	С.р.	Окремі колонії	Окремі колонії
Час появи росту (доба)	3,0±0,5	4-5	3-4	3-5	7-11	35-50	-
	37,0±0,5	4-6	3-6	3-4	3-8	21-35	14-16
Інтенсив- ність росту	3,0±0,5	пиш- ний	пиш- ний	помір- ний	помір- ний	слаб- кий	-
	37,0±0,5	помір- ний	помір- ний	пиш- ний	пиш- ний	помір- ний	помір- ний
Розмір колоній	3,0±0,5	дрібні	дрібні	дрібні	середні	дрібні	-
	37,0±0,5	дрібні	дрібні	дрібні	дрібні	дрібні	дрібні
Кількість колоній	3,0±0,5	чисе- льні	чисе- льні	чисе- льні	чисе- льні	пооди- нокі	-
	37,0±0,5	чисе- льні	чисе- льні	чисе- льні	чисе- льні	пооди- нокі	чисе- льні
Характер поверхні	3,0±0,5	S	S	S	S	R	-
	37,0±0,5	S	S	S	S	R	R

Форма колоній	3,0±0,5	прави- льна	прави- льна	прави- льна	прави- льна	непра- вильна	-
	37,0±0,5	прави- льна	прави- льна	прави- льна	прави- льна	непра- вильна	непра- вильна
Колір колоній (пігмент)	3,0±0,5	пома- ранче- вий	пома- ранче- вий	блідо- пома- ранче- вий	блідо- пома- ранче- вий	слоно- вої кістки	-
	37,0±0,5	пома- ранче- вий	пома- ранче- вий	блідо- пома- ранче- вий	блідо- пома- ранче- вий	слоно- вої кістки	слоно- вої кістки
Консис- тенція колоній	3,0±0,5	суху- вата	в'язка	в'язка	в'язка	крихка	-
	37,0±0,5	суху- вата	в'язка	в'язка	в'язка	крихка	крихка
Наявність блиску	3,0±0,5	матові	слабко блис- кучі	блис- кучі	блис- кучі	матові	-
	37,0±0,5	матові	слабко блис- кучі	блис- кучі	блис- кучі	матові	матові
Емульго- ваність у фіз. розчині	3,0±0,5	задо- вільна	задо- вільна	задо- вільна	задо- вільна	відсут- ня	-
	37,0±0,5	задо- вільна	задо- вільна	задо- вільна	задо- вільна	відсут- ня	відсут- ня
Ріст на МПА	3,0±0,5	+	+	+	+	-	-
	37,0±0,5	+	+	+	+	-	-
	3,0±0,5	+	+	+	+	-	-

Ріст на МПБ	37,0±0,5	+	+	+	+	-	-
----------------	----------	---	---	---	---	---	---

Примітка: С.р. – суцільний ріст

ДОДАТОК Г

Морфологічні ознаки й тинкторіальні властивості вихідних культур та субкультур

Показник	Температура культивування (°C)	Пасаж №117-а		Пасаж №118		Пасаж №100	
		Вихідна культура	Субкультура	Вихідна культура	Субкультура	Вихідна культура	Субкультура
Форма	3,0±0,5	прямі	прямі	прямі	прямі	прямі	-
	37,0±0,5	прямі	прямі	прямі	прямі	прямі	прямі
Довжина	3,0±0,5	корот- кі	корот- кі	корот- кі	корот- кі	корот- кі	-
	37,0±0,5	корот- кі	корот- кі	корот- кі	корот- кі	корот- кі	корот- кі
Товщина	3,0±0,5	тонкі	тонкі	тонкі	тонкі	тонкі	-
	37,0±0,5	тонкі	тонкі	тонкі	тонкі	тонкі	тонкі
Розташу- вання	3,0±0,5	скуп- чення, пооди- ноко	скуп- чення, пооди- ноко	скуп- чення, пооди- ноко	скуп- чення, пооди- ноко	скуп- чення, пооди- ноко	-
	37,0±0,5	скуп- чення, пооди- ноко	скуп- чення, пооди- ноко	скуп- чення, пооди- ноко	скуп- чення, пооди- ноко	скуп- чення, пооди- ноко	скуп- чення, пооди- ноко
Тинкто- ріальні власти- вості	3,0±0,5	не- кисло- тостій- кі	не- кисло- тостій- кі	кисло- тостій- кі	кисло- тостій- кі	кисло- тостій- кі	-

(кислото- стійкість)	37,0±0,5	не- кисло- тостій- кі	не- кисло- тостій- кі	кисло- тостій- кі	кисло- тостій- кі	кисло- тостій- кі	кисло- тостій- кі
Кінці	3,0±0,5	заок- ругле- ні	заок- ругле- ні	заок- ругле- ні	заок- ругле- ні	заок- ругле- ні	-
	37,0±0,5	заок- ругле- ні	заок- ругле- ні	заок- ругле- ні	заок- ругле- ні	заок- ругле- ні	заок- ругле- ні
Зер- нистіть	3,0±0,5	вира- жена	вира- жена	слабка	слабка	вира- жена	-
	37,0±0,5	вира- жена	вира- жена	слабка	слабка	вира- жена	вира- жена
L-форми	3,0±0,5	від- сутні	від- сутні	від- сутні	від- сутні	від- сутні	-
	37,0±0,5	від- сутні	від- сутні	від- сутні	від- сутні	від- сутні	від- сутні
Елемен- тарні тільця	3,0±0,5	від- сутні	від- сутні	від- сутні	від- сутні	від- сутні	-
	37,0±0,5	від- сутні	від- сутні	від- сутні	від- сутні	від- сутні	від- сутні
Мофоло- гія	3,0±0,5	палич- ки	палич- ки	зерна	зерна	палич- ки	-
	37,0±0,5	палич- ки	палич- ки	зерна	зерна	палич- ки	палич- ки

Консис- тенція колоній	в'язка	в'язка	в'язка	в'язка	в'язка	в'язка
Наявність блиску	блискучі	блискучі	блискучі	блискучі	блискучі	блискучі
Емульго- ваність у фіз. розчині	задо- вільна	задо- вільна	задо- вільна	задо- вільна	задо- вільна	задо- вільна
Ріст на МПА	+	+	+	+	+	+
Ріст на МПБ	+	+	+	+	+	+

Примітка: С.р. – суцільний ріст

ДОДАТОК Е

Культуральні властивості культур виділених з організму жуків та
контамінованого ними зерна

Показник	Гомогенізація на 30-ту добу	Суспензія з зерна (кількість пересадок)			
		I	II	III	IV
Температура росту (°C)	37,0±0,5	37,0±0,5	37,0±0,5	37,0±0,5	37,0±0,5
Характер росту	Окремі колонії	Окремі колонії	Окремі колонії	Окремі колонії	Окремі колонії
Час появи росту (доба)	21	14	17	21	24
Інтенсив- ність росту	помірний	помірний	помірний	помірний	слабкий
Розмір колоній	дрібні	дрібні	дрібні	дрібні	дрібні
Кількість колоній	чисельні	чисельні	чисельні	поодинокі	поодинокі
Характер поверхні	R	R	R	R	R
Форма колоній	непра- вильна	непра- вильна	непра- вильна	непра- вильна	непра-вильна
Колір колоній (пігмент)	Слонової кістки	Слонової кістки	Слонової кістки	Слонової кістки	Слонової кістки

Консис- тенція колоній	крихка	крихка	крихка	крихка	крихка
Наявність блиску	матові	матові	матові	матові	матові
Емульго- ваність у фіз. розчині	відсутня	відсутня	відсутня	відсутня	відсутня
Ріст на МПА	-	-	-	-	-
Ріст на МПБ	-	-	-	-	-

ДОДАТОК Ж

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з освітньої та наукової діяльності
міжнародної
Білоцерківського національного
аграрного університету
професор



 Тетяна ДИМАНЬ

«17» 11 2023 р.

АКТ

**про впровадження/використання результатів дисертаційної роботи
у навчальний процес і науково-дослідну роботу**

Даним актом стверджується, що матеріали дисертаційної роботи Аліфонові Кіри Володимирівни «Жуки-шкідники зернових запасів: резервуар та чинник передачі мікобактерій туберкульозу», представленої на здобуття наукового ступеня доктора філософії (спеціальність 211 «Ветеринарна медицина»), використовуються у навчальному процесі та науково-дослідній роботі кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Білоцерківського національного аграрного університету.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Білоцерківського національного аграрного університету (протокол № 6 від "16 " листопада 2023 р.).

Декан
факультету ветеринарної
медицини, доцент

 Світлана ВЛАСЕНКО

Завідувач кафедри епізоотології
та інфекційних хвороб, доцент

 Тарас ЦАРЕНКО

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор наукової
та міжнародної діяльності



АКТ

про впровадження/використання результатів дисертаційної роботи у навчальний процес і науково-дослідну роботу

Даним актом стверджується, що матеріали дисертаційної роботи Аліфонові Кіри Володимирівни «Жуки-шкідники зернових запасів: резервуар та чинник передачі мікобактерій туберкульозу», представленої на здобуття наукового ступеня здобуття доктор філософії (211 «Ветеринарна медицина»), використовуються у навчальному процесі та науково-дослідній роботі кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогігієни та безпеки і якості продуктів тваринництва.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогігієни та безпеки і якості продуктів тваринництва Сумського національного аграрного університету (протокол № 5 від " 6" листопада 2023 р.).

Декан факультету ветеринарної
медицини, д.вет.н., доцент

Олександр НЕЧИПОРЕНКО

Завідувачка кафедри ветсанекспертизи,
мікробіології, зоогігієни та безпеки і
якості продуктів тваринництва
д.вет.н., професор

Тетяна ФОТІНА

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Перший проректор
Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнології
імені С. З. Гжицького,

І. Б. Турко
2023 р.

АКТ

**про впровадження результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес**

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи, яка представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – Ветеринарна медицина, аспірантки факультету ветеринарної медицини Дніпровського державного аграрно-економічного університету Аліфонові Кіри Володимирівни за темою «Жуки-шкідники зернових запасів: резервуар та чинник передачі мікобактерій туберкульозу», впроваджені у навчальний процес факультету ветеринарної медицини Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С. З. Гжицького при вивченні навчальної дисципліни «Епізоотологія та інфекційні хвороби»

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри епізоотології, протокол № 4 від 27 жовтня 2023 року.

Декан факультету ветеринарної медицини,
кандидат ветеринарних наук,
доцент

Ю.С. Стронський

Завідувач кафедри епізоотології,
доктор ветеринарних наук,
професор

Б.М. Куртяк

Професор кафедри епізоотології,
доктор ветеринарних наук,
професор

Я.В. Кісера

Затверджено
Проректор з наукової роботи
та інноваційної діяльності
Національного університету
біоресурсів і
природокористування України



Кондратюк В. М.

2023р.

АКТ

Про провадження результатів дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що матеріали дисертаційної роботи Аліфонової Кіри Володимирівни «Жуки-шкідники зернових запасів: резервуар та чинник передачі мікобактерій туберкульозу», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії, (211 «Ветеринарна медицина»), впроваджені у навчальний процес при викладанні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин», «Лабораторна діагностика заразних хвороб» у підготовці фахівців ОС «Магістр» за спеціальностями 211 «Ветеринарна медицина» та 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» та використовуються в наукових дослідженнях кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології факультету ветеринарної медицини, Національного університету біоресурсів і природокористування України, м. Київ. Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології, протокол № 10 від 15 листопада 2023 року.

Декан факультету ветеринарної медицини
док. біол. наук, професор,
академік НААН України

М. І. Цвіліховський

Завідувач кафедри епізоотології,
мікробіології і вірусології
канд. вет. наук., доцент

В. В. Мельник

164

Затверджую
Ректор Поліського національного
університету

« 14 » _____ Олег СКИДАН

« 14 » _____



2023 р.

А К Т

про впровадження/використання результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що матеріали дисертаційної роботи «Жуки-шкідники зернових запасів: резервуар та чинник передачі мікобактерій туберкульозу» Аліфонової Кіри Володимирівни, здобувача наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» Дніпровського державного аграрно-економічного університету, прийняті до використання в навчальному процесі (для проведення лекційних і лабораторних занять із дисциплін «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин», «Методи мікробіологічних досліджень» із студентами 4-6 курсу, які здобувають вищу освіту освітнього ступеня «Магістр» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина») та наукових дослідженнях на кафедрі мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології Поліського національного університету. Особливу наукову та методичну цінність мають методики дослідження комах та виділення з їх організму мікобактерій.

Матеріали розглянуті та схвалені на засіданні кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології (протокол № 6 від 14.11.2023).

Завідувач кафедри мікробіології,
фармакології та ветеринарної епідеміології,
доктор вет. наук, професор

Олександр ГАЛАТЮК

Секретар, кандидат вет. наук, доцент

Діана ФЕЩЕНКО

ДОДАТОК 3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової та інноваційної
діяльності Дніпровського державного
аграрно-економічного університету
доктор сільськогосподарських наук,
професор
ТКАЛІЧ Юрій
20__ р.



ВИСНОВОК З БІОЕТИЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ

Дніпровського державного аграрно-економічного університету щодо експериментальних досліджень, аспірантки Дніпровського державного аграрно-економічного університету Аліфонові Кіри Володимирівни викладених у дисертаційній роботі на здобуття ступеня доктор філософії (PhD) «Жуки-шкідники зернових запасів: резервуар та чинник передачі мікобактерій туберкульозу»

Комісія з проведення біоетичної експертизи Дніпровського державного аграрно-економічного університету у складі Склярова Павла Миколайовича, доктора ветеринарних наук, професора кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології; Сосницького Олександра Івановича, доктора ветеринарних наук, професора кафедри інфекційних хвороб тварин; Бібена Івана Андрійовича, кандидата ветеринарних наук, доцента кафедри паразитології та ветеринарно-санітарної експертизи, декана факультету ветеринарної медицини; Зажарського Володимира Володимировича, кандидата ветеринарних наук, доцента кафедри інфекційних хвороб тварин; Чумака Владислава Олександровича, кандидата ветеринарних наук, доцента кафедри фізіології, біохімії тварин і лабораторної діагностики розглянула експериментальні дослідження, проведені автором і представлені в дисертаційній роботі на тему: «Жуки-шкідники зернових запасів: резервуар та чинник передачі мікобактерій туберкульозу».

Висновок комісії: експериментальні дослідження аспіранки факультету ветеринарної медицини Дніпровського державного аграрно-економічного університету Аліфонові Кіри Володимирівни «Жуки-шкідники зернових запасів: резервуар та чинник передачі мікобактерій туберкульозу» проведені на мінімальній кількості лабораторних тварин (морські свинки) з урахуванням «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах», схвалених на Національному конгресі з біоетики (м. Київ, 2001 р.). із дотриманням міжнародних вимог Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних і інших наукових

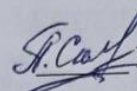
цілей» (Страсбург, 1986 р.) і відповідають закону України «Про Захист тварин від жорстокого поводження» (м. Київ, 2006 р.).

При утриманні дослідних тварин дотримувалися основних принципів біоетики, а саме – недопущення спраги, недоїдання, голоду, дискомфорту при утриманні та стресу при проведенні експерименту.

Безболісне умертвіння тварин проводили під загальною анестезією загальноприйнятим методом.

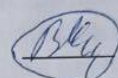
Голова комісії:

доктор ветеринарних наук, професор

 П.М. Скларов

Секретар комісії:

кандидат ветеринарних наук, доцент

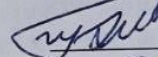
 В.О. Чумак

Члени комісії:

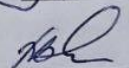
доктор ветеринарних наук, професор

 О.І. Сосницький

кандидат ветеринарних наук, доцент

 І.А. Бібен

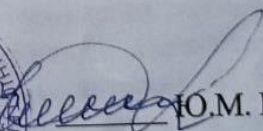
кандидат ветеринарних наук, доцент

 В.В. Зажарський

Підписи професорів Скларова П.М., Сосницького О.І., доцентів Чумака В.О., Бібена І.А., Зажарського В.В. «Завіряю»:

Начальник відділу кадрів
Дніпровського ДАЕУ



 Ю.М. Карамушка