

(2.5 and 5 %) acids in experiments. The exhibition of processing was 1, 5, 10 and 20 minutes. All measurements were carried out at a height of water column 53 sm.

Shell penetration was determined by V.O. Breslavets, V.A. Zakharenko and Yu.R. Knyazev method. For research it was used egg shell, without internal contents and pieces of shell without subshell membranes. It was found that treatment of geese eggs with 5 % acetic or hydrochloric acid is increased breathability of shell in 1.7 and 1.9 respectively and its vapor penetration in 1.5 and 2.0 times.

Strength and elastic deformation of the shell were determined for blunt, sharp ends of egg and its inside, treated with acetic and hydrochloric acids, and not processed. For research there were used unfertilized eggs after the first viewing. No significant changes in the value of indicators of elastic deformation and strength of egg shell treated with 5 % hydrochloric or acetic acid were observed.

Keywords: air percolation, exhalation percolation, egg-shell, goose, acetic acid, hydrochloric acid.

УДК 619:579.873.21:57.083.13

ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ

Калашник Н.В.

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков, Украина, e-mail: nick.v.kalashnik@gmail.com

Испытаны ростовые свойства питательной среды для индикации и культивирования микобактерий в сравнительном аспекте со средой Левенштейна-Йенсена. Элективность изготовленных питательных сред изучали с использованием референтных штаммов микобактерий *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium* и культуры *M. fortuitum*, а также проб биоматериала от крупного рогатого скота, реагирующего на туберкулин (ППД) для млекопитающих. Установлено, что разработанная плотная питательная среда обеспечивает выделение и обильный рост возбудителей туберкулеза.

Ключевые слова: туберкулез, бактериологическая диагностика, микобактерии, биоматериал, питательные среды, элективные свойства, скорость и интенсивность роста.

Туберкулез является одним из особо опасных инфекционных заболеваний и представляет большую угрозу для животных и здоровья человека. Данное заболевание наносит значительный экономический ущерб отрасли животноводства, а именно: снижение продуктивности, недополучение продукции (молока, мяса, приплода, генетического материала), вынужденного убоя реагирующих животных, а также проведения дополнительных комплексных диагностических исследований и ветеринарно-санитарных мероприятий в неблагополучных хозяйствах. Так, в период с 1960 по 2010 гг. общий фактический экономический ущерб от туберкулеза КРС составил 8 446 364 178,2 грн.; с 1991 г. по 2010 г. данный показатель составлял 918 483 214,2 грн. При этом, затраты на одно животное составили 2991,6 грн. [2].

В системе мер профилактики и борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота большое значение имеет своевременная и эффективная диагностика данного заболевания. По данным Всемирной организации по охране здоровья животных (МЭБ) культуральный метод исследования на туберкулез является наиболее надежным и достоверным. Традиционно, культивирование микобактерий на питательных средах является «золотым стандартом» для подтверждения наличия инфекции и постановки окончательного диагноза на туберкулез. Посев биологического материала на специальные, элективные питательные среды позволяет получить чистые культуры микобактерий, провести их идентификацию, изучить биологические, биохимические свойства, а также лекарственную устойчивость у изолированных культур микобактерий. Чувствительность данного метода намного выше микроскопического, так как позволяет получить положительный результат при наличии в 1 мл исследуемого материала от 20 до 100 микобактериальных клеток [1, 8].

Однако выделение микобактерий из биологического материала имеет определенные трудности, связанные с биологическими и таксономическими особенностями возбудителя, а именно медленного роста при культивировании на питательных средах [3, 6, 7].

Результаты культурального исследования на туберкулез во многом зависят от элективных свойств используемой для посевов питательной среды. В практике медицинских и ветеринарных лабораторий в разных странах для культурального метода исследования на туберкулез применяют: яичные (Левенштейна-Йенсена, Гельберга, Фаст-ЗП, Петраньяни, среда с салицилатом натрия, Ogawa, Stonebrink, агаровые (Middlebrook 7H10, 7H11) и жидкие (среда Сотона (Sauton) Middlebrook 7H9, Proskauer & Beck, Kirchner, Dubos) питательные среды [4, 5].

При этом необходимо отметить, что информативность применяемых питательных сред неодинакова. Первичный рост возбудителей туберкулеза на этих средах можно обнаружить в сроки от 35 до 60 дней, а в некоторых случаях – в более отдаленные сроки [4, 5, 6].

В связи с тем, что в состав этих сред входят дорогостоящие ингредиенты, а для обеспечения лабораторий ветеринарной медицины отечественная биологическая промышленность данных сред не выпускает, целью наших исследований и явилась разработка плотной питательной среды для культурального исследования на туберкулез.

Материалы и методы. Для выполнения поставленной цели была приготовлена питательная среда, содержащая в своем составе калий фосфорнокислый двузамещенный, магний сернокислый, натрий лимоннокислый, гликокол, натрий L-глутаминовокислый, аммоний лимоннокислый однозамещенный, цинк сернокислый, глицерин, раствор малахитового зеленого, воду дистиллированную при определенном соотношении компонентов.

Элективные свойства приготовленных сред изучали с использованием референтных штаммов микобактерий *M. bovis*, (шт. *Vallee*), *M. tuberculosis* (шт. *H37Rv*), *M. avium* (шт. *M. avium* ИЭКВМ-УААН) и атипичной культуры микобактерий IV группы по классификации Раньона (*M. fortuitum*), а также 10 проб биоматериала от реагирующего на туберкулин (ПГД) для млекопитающих крупного рогатого скота из неблагополучного по туберкулезу хозяйства, у которых на секции были обнаружены характерные для туберкулеза изменения.

При проведении патологоанатомического исследования от каждого отдельно забитого животного отбирали: заглочные, подчелюстные, предлопаточные, бронхиальные, средостенные, порталые, брыжеечные, надвыменные, коленной складки лимфатические узлы, а также кусочки внутренних органов (легкие, печень, селезенка).

Предпосевную обработку проб биоматериала от реагирующих на туберкулин животных проводили по методу А.П. Аликаевой.

На приготовленные питательные среды отдельно высевали взвеси культур микобактерий каждого вида, а также пробы биоматериала от животных в дозе 0,5 мл на каждую пробирку.

После посева культур микобактерий и проб биоматериала пробирки с посевами закрывали ватно-марлевыми пробками, размещали в штативы в наклонном положении под углом 45° и культивировали в термостате при температуре 37±0,5 °С на протяжении 3 суток. После этого пробирки размещали в бактериологические штативы, пробки заливали парафином и культивировали в термостате при температуре 37±0,5 °С.

Учет роста колоний референтных штаммов и проб биоматериала на питательных средах проводили ежедневно в течении первых 16 суток и до 90 суток с интервалом 5–7 дней. В качестве контроля использовали яичную среду Левенштейна-Йенсена.

Результаты исследований. При учете роста колоний микобактерий на поверхности питательных сред было установлено, что первичный рост на питательной среде для индикации и культивирования микобактерий наблюдали у референтных культур *M. bovis* и *M. tuberculosis* на 10–15 сутки, у культуры *M. avium* на 7–10, а культуры *M. fortuitum* – на 3–5 сутки после посева. На контрольной среде наличие первичного роста культур микобактерий устанавливали на 16–20, 10–13 и 5–7 сутки соответственно.

При культуральном исследовании биоматериала от КРС первичный рост колоний возбудителя туберкулеза вида *M. bovis* на разработанной питательной среде наблюдали на 13–19 сутки, а на контрольной среде на 21–29 сутки. Вместе с тем, наряду с возбудителем туберкулеза *M. bovis*, из биоматериала были выделены культуры атипичных микобактерий. Первичный рост колоний атипичных микобактерий на питательной среде для индикации и культивирования микобактерий наблюдали на 5–10 сутки, в то время как на среде Левенштейна-Йенсена – на 6–15 сутки соответственно. Выделенные культуры атипичных микобактерий были отнесены к II, III и IV группам по классификации Раньона.

Результаты показателей скорости первичного роста культур микобактерий приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Скорость первичного роста микобактерий разных видов на питательных средах

Номер питательной среды	Скорость роста, дней					
	<i>M. bovis</i> шт. <i>Vallee</i>	<i>M. tuberculosis</i> шт. <i>H37Rv</i>	<i>M. avium</i> шт. <i>M. avium</i> ИЭКВМ-УААН	<i>M. fortuitum</i>	Биоматериал от КРС	
					<i>M. bovis</i>	Атипичные микобактерии
1	16-20	16-20	10-13	5-7	21-29	6-15
2	10-15	10-15	7-10	3-5	13-19	5-10

Примечания: «№ 1» – среда Левенштейна-Йенсена; «№ 2» – Питательная среда для индикации и культивирования микобактерий.

При этом необходимо отметить, что культура *M. bovis* на среде Левенштейна-Йенсена росла в виде отдельных, мелких, шероховатых, шаровидной формы колоний цвета слоновой кости. На питательной среде № 2 отмечался более интенсивный характер роста колоний микобактерий. Культура *M. tuberculosis* на этих же средах росла в виде мелких, морщинистых, сухих, цвета слоновой кости колоний, а культуры *M. avium* и *M. fortuitum* – в виде мягких, выпуклых, с гладкой матовой поверхностью, серовато-белых колоний.

Результаты интенсивности роста культур *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, а также проб патологического материала от больных туберкулезом животных приведены в таблице 2.

Из материалов, приведенных в таблице 2 видно, что на разработанной питательной среде отмечали первичный рост 5–7 колоний референтных штаммов возбудителей туберкулеза *M. bovis*, *M. tuberculosis* на 10 сутки. На 21 день их количество увеличилось в 2 раза. Культура *M. avium* выросла на 7 день после посева, а на 13 день культивирования количество колоний на поверхности питательной среды увеличилось до 15–20. Из патологического материала рост 6 колоний микобактерий наблюдали на 13 день после посева. На поверхности контрольной среды Левенштейна-Йенсена установили наличие от 3 до 5 колоний культуры *M. avium* на 10 день после посева. До 5 колоний культур *M. bovis*, *M. tuberculosis* выросло на 16 день, а из проб биоматериала – от 3 до 4 колоний на 21 день культивирования.

Таблица 2 – Интенсивность роста микобактерий на питательных средах

Рост колоний (через дней)	Питательная среда для индикации и культивирования микобактерий				Среда Левенштейна-Йенсена			
	Штамм Vallee	Штамм H37Rv	Штамм <i>M. avium</i>	Пат. материал (культура <i>M. bovis</i>)	Штамм Vallee	Штамм H37Rv	Штамм <i>M. avium</i>	Пат. материал (культура <i>M. bovis</i>)
7	-	-	+	-	-	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-	+	-
13	+	+	++	+	-	-	+	-
16	+	+	++	+	+	+	++	-
21	++	++	+++	++	+	+	++	+
24	#	#	#	++	++	++	+++	+
29	#	#	#	+++	++	+++	+++	+
31	#	#	#	+++	+++	+++	#	+
38	#	#	#	#	#	#	#	++
45	#	#	#	#	#	#	#	++
52	#	#	#	#	#	#	#	+++
60	#	#	#	#	#	#	#	#
66	#	#	#	#	#	#	#	#
71	#	#	#	#	#	#	#	#
78	#	#	#	#	#	#	#	#
85	#	#	#	#	#	#	#	#
90	#	#	#	#	#	#	#	#

Примечания: «-» – отсутствие роста колоний; «+» – рост от 5 до 10 колоний; «++» – рост от 10 до 20 колоний; «+++» – рост от 20 до 50 колоний; «++++» – сплошной рост колоний

Через 24 дня после посева количество колоний *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, выросших на разработанной питательной среде превысило показатель 50 в каждой пробирке, а в отдельных пробирках отмечали интенсивный рост микобактерий на всей поверхности питательной среды. Аналогичная интенсивность роста колоний микобактерий из проб патологического материала была установлена на 29–38 день после посева.

На контрольной среде Левенштейна-Йенсена такая же интенсивность роста колоний была установлена только на 31–38 сутки у культур *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium* и на 52–60 сутки – из проб патологического материала от крупного рогатого скота.

Выводы. Разработанная питательная среда для индикации и культивирования микобактерий обеспечивает рост референтных штаммов микобактерий на 3–7 дней раньше по сравнению с контрольной средой Левенштейна-Йенсена, а также изоляцию эпизоотических культур из биоматериала и может быть использована в ветеринарной практике для проведения культурального исследования на туберкулез.

Список литературы

1. Вейсфейлер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерии [Текст] / Ю.К. Вейсфейлер – Б.: Изд-во АН Венгрии, 1975. – 366 с.
2. Економічні збитки від туберкульозу великої рогатої худоби в Україні [Текст] / О.А. Ткаченко, В.В. Захарський, Н.В. Алексєєва [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2013. – № 1 (203). – С. 6 – 10.
3. Зыков М.И. Потенциально патогенные микобактерии и лабораторная диагностика микобактериозов [Текст] / М.И. Зыков, Т.Б. Ильина. – М.: Медицина, 1978. – 176 с.
4. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований [Текст] / А.С. Лабинская – М.: Медицина, 1978. – 394 с.
5. Микробиологические и вирусологические методы исследования в ветеринарной медицине: справ. пособие [Текст] / Под ред. А. Н. Головки. – Х.: НТМТ, 2007. – 511 с.
6. Модель Л.М. Биология туберкулезных микобактерий [Текст] / Л.М. Модель – М.: Медгиз, 1958. – 315 с.
7. Bergey's manual of Systematic Bacteriology [Text]: The Actinobacteria, Part A / M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse [at al.] – Second edition, Vol. 5, – NY, 2012. – P 312-376
8. OIE of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals [Electronic resource]. – ch. 2.4.7., Bovine tuberculosis. – 2009. – Access mode: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf – Title from the screen.

THE NUTRIENT MEDIUM FOR INDICATION AND CULTIVATION OF MYCOBACTERIA

Kalashnyk M.V.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov, Ukraine

The aim: development of solid medium for cultural study of tuberculosis.

*Materials and methods. The nutrient medium was made based on eggs with certain ratio of components. The Lowenstein-Jensen medium has been used as control. Elective properties of prepared nutrient media was studied using reference strains of mycobacteria *M. bovis* (strain Vallee), *M. tuberculosis* (strain H37Rv), *M. avium* (strain *M. avium* IECVM-UAAS) and atypical culture of mycobacteria of IV group by Runyon classification (*M. fortuitum*) and with 10 samples of biomaterial from cattle reacting on tuberculin (PPD) for mammals on troubled for tuberculosis farm. Pre-seeding processing of biomaterial samples was carried out by A. P. Alikaeva's method. Suspensions of mycobacteria cultures and samples of biomaterials has been seeded on nutrient media. Growth activity of mycobacteria colonies was controlled during 90 days with in an interval of 5–7 days.*

*The results of investigations. The initial growth of reference cultures *M. bovis* and *M. tuberculosis* was observed on 10th-15th day, *M. avium* — on 7th-10th day, *M. fortuitum* — on 3th-5th day after inoculation. Initial growth of colonies of the tuberculosis agent *M. bovis* was observed on 13th-19th day and in case of atypical mycobacteria cultures — on 5th-10th day from samples of biological material.*

*Initial growth of reference cultures has been noted on the control medium on 16th-20th, 10th-13th, and 5th-7th days respectively. The culture *M. bovis* was grew on 21th-29th day from biomaterial samples and atypical mycobacteria — on 6th-15th day. Atypical cultures of mycobacteria were classified to the II, III and IV groups by Runyon classification.*

*Intensity of growth was higher than 50 colonies in one test-tube of *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium* on the test medium. The massive growth was in certain test-tubes. Analogous results of growth of mycobacteria colonies were obtained from biomaterial on 29th-38th day after seeding.*

*The same intensity of mycobacteria colonies growth was determined on control medium for *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium* cultures on 31th-38th day and for samples of biological material from cattle on 52th-60th day.*

Conclusions. The nutrient medium for indication and cultivation of mycobacteria that was developed provides earlier growth of reference strains of mycobacteria for 3–7 days than control and isolation of epizootic cultures from biomaterial. The developed nutrient medium can be used for conducting of the cultural investigation on tuberculosis in veterinary practice.

Keywords: tuberculosis, bacteriological diagnostic, mycobacteria, biomaterial, nutrient media, elective properties, rate and intensity of growth.

УДК 619: 615: 37.012

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА ОСНОВЕ МЯСНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ

Самуйленко А.Я., Раевский А.А., Еремец Н.К., Школьников Е.Э., Анисимова Л.В.,
Соловьев Л.Б., Павленко И.В., Коротеева Л.А., Тимофеев С.В.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Российская Федерация, e-mail: vnitibp@mail.ru

В статье изложены материалы исследований по культивированию вакцинных штаммов сальмонелл в питательных средах на основе перевара Хоттингера. Определены основные технологические параметры процесса глубинного управляемого культивирования, изготовлены опытные серии вакцины, определены оптимальные сроки хранения.

Ключевые слова: гидролизаты, сальмонеллы, вакцинные штаммы, культивирование, вакцина.

Важнейшим из условий при производстве вакцинных и диагностических препаратов, а также при проведении бактериологических исследований являются полноценные питательные среды и их основы. В биологической промышленности в качестве основы питательной среды используют мясо высших категорий качества, которое во все времена было и остается ценным и дорогим пищевым продуктом. И именно поэтому внимание исследователей в медицине и ветеринарии постоянно направлено на изыскание более дешевых и доступных источников белка для приготовления бактериологических питательных сред и их основ. Для этого используют растительные белки, отходы рыбной промышленности, белки молока, продукты переработки куриных эмбрионов и др.

Наряду с этим в настоящее время проводятся исследования по усовершенствованию технологии культивирования микроорганизмов для получения баккультур, используемых в дальнейшем при производстве вакцинных и диагностических препаратов.