

УДК616:616.98:579.873.21:616-076

**А. І. ЗАВГОРОДНІЙ**, док.тор ветеринарних наук, професор, чл.-кор. НААН

**С. А. ПОЗМОГОВА**, кандидат ветеринарних наук

**М. О. ГРКА**, аспірант

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної клінічної ветеринарної медицини», (м. Харків)*

## **ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ КУЛЬТУРАЛЬНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ НА ПАРАТУБЕРКУЛЬОЗ**

*У статті висвітлені проблеми культурального дослідження на паратуберкульоз в Україні, представлені результати розробки поживного середовища з вмістом спиртового екстракту *M. scrofulaceum*, що забезпечує ефективне виділення збудника паратуберкульозу з біоматеріалу та з проб об'єктів зовнішнього середовища. Для одержання максимальної кількості бактеріальної маси ізольованих культур *M. avium subspecies paratuberculosis* (MAP) найбільш ефективним є модифіковане поживне середовище до складу якого додатково входять лимонно-аміачне залізо та інші стимулюючі компоненти. Перспектива подальших досліджень полягає у тому, що накопичення достатньої кількості бактеріальної маси культури збудника паратуберкульозу може використовуватись для розробки біологічних препаратів при діагностиці цього захворювання.*

*Ключові слова: паратуберкульоз, культивування, *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, живильні середовища.*

Захворювання тварин на паратуберкульоз спричиняє значні економічні збитки, які складаються із втрат від вибраковки племінної худоби, зниження продуктивності, порушення відтворювальної здатності, загибелі інфікованих тварин. Зважаючи на те, що Україна межує з неблагополучними щодо паратуберкульозу країнами Європи і має з ними тісні торгівельні стосунки, то існує ризик занесення збудника цієї хвороби і на територію нашої держави.

Перші дослідження з виділення та культивування *M. avium subspecies paratuberculosis* (MAP) були проведені в 1912 р. Twort і Ingram [1]. На сьогодні в світі найчастіше використовуються комерційні середовища Левенштейна – Йенсена, Геррольда, Дюбо, Міддлбука 7Н9, 7Н10 і 7Н11 (агар або бульйон) з обов'язковим додаванням імпортного компонента *Mycobacterin J*. Вартість комерційного середовища Левенштейна – Йенсена або Геррольда становить від 3 до 5 доларів США за одну пробірку, а одного флакону з *Mycobacterin J* (2 мкг) – більше 100 доларів. Крім того, для пригнічення росту сторонньої мікрофлори, незалежно від способу передпосівної обробки матеріалу, в усі комерційні середовища додаються різні протигрибкові препарати, що також збільшує їх вартість.

У гуманній мікробіології використовують альтернативні культуральному методу дослідження на паратуберкульоз (хворобу Крона) на основі виявлення радіометричного та люмінесцентного сигналу росту MAP з використанням рідких комерційних середовищ ВАСТЕС12В і МГІТParaТВ. Запропоновані середовища дозволяють раніше виявляти MAP у клінічних зразках. Однак, у порівнянні з

щільними середовищами, ці середовища ускладнюють ідентифікацію виділених ізолятів, так як візуального росту колоній тамікобактин – залежності в цьому випадку не спостерігається, а ріст інших мікобактерій необхідно відрізнити за допомогою ПЛР. Проте, основні недоліки використання системи ВАСТЕС – його висока вартість і складність утилізації радіоізотопу  $\text{CO}_2$ , що входить до складу середовища. Тому багато авторів вважають, що для первинної ізоляції *MAR* найбільш оптимальними є середовища на основі яєчного жовтка або цілих яєць, у яких необхідний вміст фосфоліпідів дозволяє нейтралізувати залишки деконтамінуючих речовин, що використовуються при передпосівній обробці. Інші ж середовища такою здатністю не володіють [2,3].

Ураховуючи високу вартість імпортного мікобактину та готових комерційних середовищ виникає необхідність розробки вітчизняних поживних середовищ для виділення *MAR*.

**Мета роботи.** Розробити поживні середовища для виділення ізолятів з біоматеріалу *MAR* і культивування субкультур з будника паратуберкульозу.

**Матеріалитаметоди.** Було виготовлено 6 варіантів яєчних середовищ на основі “Сухого живильного середовища для культивування мікобактерій”. У залежності від активності речовин середовища розділили на 5 груп: I гр. – середовище, до складу якого входить розчин наночастинок Fe в концентраціях 0,6; 1,3; 1,9  $\text{мг/см}^3$ ; II гр. – з розчином цитрату Ag і цитрату Cu (1:1) в концентраціях 0,0125; 0,075 і 0,15  $\text{мг/см}^3$  (у перерахунку на активні діючі речовини); III гр. – з вмістом спиртового екстракту *M.phlei*; IV гр. – з вмістом спиртового екстракту *M. scrofulaceum*; V гр. – модифіковане середовище, до складу якого додатково входять лимонноаміачне залізо та інші стимулюючі компоненти; VI гр. – контрольне середовище (“Сухе живильне середовище для культивування мікобактерій” з додаванням комерційно гомусобактин J). На виготовлені поживні середовища висівали за висіви референтного штаму *M.Johne* та епізоотичної культури № 5809 в концентраціях 1  $\text{мг/см}^3$  (на фізіологічному розчині), виділеної від ВРХ, а також суспензію проб біологічного матеріалу та проб фекалій від експериментально інфікованих збудником паратуберкульозу кроликів. Передпосівну обробку біоматеріалу (печінка, тонкий відділ кишечника, селезінка) проводили 5% щавлевою кислотою, зразків фекалій – 0,9% N-цетилпіридинієм хлоридом. Пробірки з посівами культивували за температури  $37,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  протягом 6-ти місяців. Ростою активність виготовлених поживних середовищ для первинного виділення *MAR* визначали за швидкістю (кількість діб) появи перших колоній та інтенсивністю (в хрестах) росту культур. Середовища для культивування субкультур оцінювали за максимальним накопиченням бактеріальної маси (в мг) через 90 діб культивування. Кількість бактеріальної маси субкультури визначали шляхом різниці ваги порожнього флакону та флакону з бактеріальною масою з однієї пробірки (мг) після 3-х місяців культивування.

**Результатидослідження.** Результати вивчення елективних властивостей поживних середовищ наведені в таблиці 1.

Із даних таблиці видно, що на виготовленому поживному середовищі із додаванням спиртового екстракту *M. phlei* (III група) первинний ріст поодиноких колоній референтного штаму і епізоотичної культури *MAR* виявляли на 15 добу і на 30 добу культивування кількість колоній та на ньому становила 10 – 20 колоній на одній

пробірки. На середовищі з додаванням екстракту *M. scrofulaceum* (IV група) та на модифікованому середовищі (V група) первинний ріст колоній референтного штаму та епізоотичної культури спостерігали на 10 добу. Однак слід зазначити, що на 30 добу культивування кількість колоній на середовищі з екстрактом *M. scrofulaceum* (IV група) становила 20–30 колоній. На модифікованому середовищі (V група) ріст колоній був інтенсивніший, і на 30 добу культивування колонії виростили по всій поверхні поживного середовища. Через 3 місяця культивування кількість бактеріальної маси субкультур на цьому середовищі складала 150 – 200 мг з однієї пробірки, тоді як на інших середовищах (III, IV, VI група) не перевищувала 80 мг. Тому модифіковане нами середовище (V група) при культивуванні субкультур дозволяє отримати максимальну кількість бактеріальної маси.

Таблиця 1

## Елективні властивості поживних середовищ

Показники росту	Поживні середовища									
	I (концентрація активної речовини Fe мг/см <sup>3</sup> )			II (концентрація активної речовини, Ag мг/см <sup>3</sup> )			III (з екстр. <i>M.phl.</i> )	IV (з екстр. <i>M.scr.</i> )	V модиф. середов.	VI (з мус. J)
	0,6	1,3	1,9	0,025	0,075	0,15				
швидкість/ інтенсивність росту <i>M.Johnei</i>	-	-	90/+	-	60/+	-	15/+ 30/++	10/+ 30/+++	10/+ 30/++++	15/+ 30/++
кількість бакм аси <i>M.Johnei</i> (мг)	-	-	25-30	-	20-25	-	60-80	60-80	150-200	60-70
швидкість/ інтенсивність росту №5809	-	-	120/+	-	60/+	-	15/+ 30/++	10/+ 30/+++	10/+ 30/++++	15/+ 30/++
кількість бакм аси №5809, (мг)	-	-	20-25	-	20-25	-	50-70	50-70	150-200	50-70
ріст з біоматеріалу (діб)	-	-	-	-	-	-	90-120	80-100	від 4 до 6 міс.	90-120
ріст з фекалій (діб)	-	-	-	-	-	-	90-120	90-100	від 4 до 6 міс.	90-120
Примітка: 1. чисельник – швидкість росту (діб) 2. знаменник – інтенсивність росту (у хрестах) 3. + – від 1 до 10 колоній 4. ++ – від 10 до 20 колоній 5. +++ – від 20 до 30 колоній 6. ++++ – колонії по всій поверхні середовища										

Відносно поживних середовищ I та II груп, то встановлено, що вони мали невисокі ростові властивості. Ріст поодиноких колоній субкультур на середовищі I гр. з концентрацією наночастинок Fe  $1,9 \text{ мг/см}^3$  спостерігали через 90 – 120 діб культивування, а на середовищі II групи з вмістом  $0,075 \text{ мг/см}^3$  цитрату Ag і цитрату Cu (1:1) – тільки через 2 місяці культивування. Накопичення бактеріальної маси вивчаємих культур складалося більше 25 -30 мг. При інших концентраціях діючих речовин росту культур наших середовищах не встановлено.

З метою розробки середовища для первинної ізоляції збудника паратуберкульозу з проб біологічного матеріалу та з об'єктів зовнішнього середовища (зокрема фекальні маси) були інфіковані кролики референтним штамом *MAP*. При цьому, було встановлено, що культура референтного штаму, раніше адаптована до росту *invitro*, після пасажування її через організм тварини втрачає здатність до швидкого росту на поживних середовищах.

При визначенні оптимального поживного середовища для первинної ізоляції збудника паратуберкульозу можна зробити висновок, що первинний ріст колоній на середовищах з додаванням спиртових екстрактів *M.phlei* (III група) та на контрольному середовищі (VI група) спостерігали на 90 – 120 добу після висіву. На середовищі із додаванням спиртового екстракту *M. scrofulaceum* (IV), ріст колоній відмічали на 80 – 100 добу після висіву. Тому слід зазначити, що на середовищі із *M. scrofulaceum* (IV група), ріст первинних колоній було встановлено на 10 – 20 діб раніше, ніж на середовищах інших груп. На середовищі V групи перші ознаки росту поодиноких колоній спостерігали через 4 – 6 місяців культивування. За весь період дослідження росту збудника паратуберкульозу з проб біологічного матеріалу і фекальних мас на середовищах I і II групи не виявляли.

Результат проведених досліджень свідчить, що для виділення *MAP* із біоматеріалу та проб з об'єктів зовнішнього середовища найбільш оптимальним є поживне середовище з додаванням спиртового екстракту *M. scrofulaceum*, яке дозволяє в більш ранні строки ізолювати *M. avium subspecies paratuberculosis*.

**Висновки.** Розроблене поживне середовище з вмістом спиртового екстракту *M.scrofulaceum* (IV група) забезпечує виділення збудника паратуберкульозу із біоматеріалу та з проб об'єктів зовнішнього середовища.

Для одержання максимальної кількості бактеріальної маси ізольованих культур *MAP* найбільш придатним є розроблене нами модифіковане поживне середовище (V група) до складу якого додатково входять лимонноаміачне залізо та інші стимулюючі компоненти.

### Список використаної літератури

1. Whipple D. L. (1983) Modification in the technique for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. In: Merkal, R.S. (ed) Proceedings of the International Colloquium on Research in Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Ames, Iowa pp. 82–92.
2. Merkal R. S. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*/ R. S. Merkal, B. J. Curran// Applied Microbiology. – 1974. – № 28. – P. 276–79.
3. Cousins D. V. Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*/ D. V. Cousins, R. J. Evans, B. R. Francis // Australian Veterinary Journal. – 1995. – № 72. – P. 458–462.

## **ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТУРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НА ПАРАТУБЕРКУЛЁЗ/А. И. Завгородний, С. А. Позмогова, М. А. Гирка**

*В статье освещены проблемы культурального исследования на паратуберкулез в Украине, представлены результаты разработки питательной среды с содержанием спиртового экстракта *M. scrofulaceum*, что обеспечивает эффективное выделение возбудителя паратуберкулеза с биоматериала и из проб объектов внешней среды. Для получения максимального количества бактериальной массы изолированных культур *M. avium subspecies paratuberculosis* (MAP) наиболее эффективным является разработанная модифицированная питательная среда в состав которой дополнительно входят лимонноаммиачное железо и другие стимулирующие компоненты. Перспектива дальнейших исследований заключается в том, что накопленная бактериальная масса культуры возбудителя паратуберкулеза, может быть использована для разработки биологических препаратов при диагностике паратуберкулеза.*

*Ключевые слова: паратуберкулез, культивирование, *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, питательные среды.*

## **GROWING MEDIUM FOR THE PARATUBERCULOSIS CULTURE RESEARCH / A. I. Zavgorodny, S. A. Pozmogova, M. A. Girka**

*The paper highlights the problems of paratuberculosis culture research in Ukraine. It presents the results of the culture medium containing alcoholic extract of *M. scrofulaceum*, which ensures effective paratuberculosis pathogen isolation from samples of biological material and environmental objects.*

*To get the maximum number of bacterial mass of isolated cultures *M. avium subspecies paratuberculosis* (MAP) the most effective is modified nutritional medium with the addition of the included lemon ammonia ferrum and other stimulating ingredients. The prospect of further researches lies in the fact that the cumulative weight of the bacterial pathogen of paratuberculosis culture, can be used to develop biological products in the diagnosis of paratuberculosis.*

*Key words: paratuberculosis, cultivation, *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, growing medium.*

**Рецензент – кандидат ветеринарных наук Е. П. Петренчук**