в еритроцитах периферичної крові білих нелінійних щурів у разі застосування мікроядерного тесту за аскарозу // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. – Дніпропетровськ, 2005. – №1. – С. 92-95. ***9.*** Cimino M.C. New micronucleus guideline for the U.S. environmental protection agency. U.S. EA, office of Toxic Substances, Health and Environmental Review Division, Washington DC // Mutat. Res. Envir. and Mol. Mutagen. — 1991. —Vol. 17, Suppl. 19. — P. 83. ***10.*** Fenech M., Hoolland N., Chang W.P., Zeiger E., Bonassi. The Human MicroNucleus Project- An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damaqe in humans // Mutat. Res. Fund. And Mol. Mech. of Mutagen. – 1999. — Vol. 428. — P.271-283. ***11.*** Hamada, S., Sutou, S., Morita, T., Wakata, A., Asanami S. et al. Evaluation of the rodent mi- cronucleus assay by a 28-day treatment protocol: summary of the 13th collaborative study by the collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT) / Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS) - Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS) // Envir. and Mol. Mutagen. - 2001.-Vol. 37.-P. 93-110. ***12.*** Heddle, J. A rapid in vivo test for chromosomal damage // Mutat. Res. - 1973. -Vol. 18, Na 2. – P. 187-190. ***13.*** Heddle, J.A., Carrano A.V. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone mar row by y-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragements // Mutat. Res. — 1977. — Vol. 44. — P. 63-69. ***14.*** Kirsch-Volders M., Sofiini T., Aardema M., Alberttai S., Eastmond D. Report from the in vitro micronucleus Assay Working Group // Mutat. Res. Envir. and Mol. Mutagen. — 2000. – Vol. 35 — .P.167-172. ***15.*** Ribeiro L.R., Takahashi C. S., Erdman B., Olivera S.V., Docosta C.T.A., Glunncler-Lus M.C. Interlaboratory calibration program for the mouse micronucleus test // II Rev. Bras, genet. — 1993, — Vol. 16, JVa 3.-P. 631-638. ***16.*** Schmid, W. The micronucleus test // Mutat. Res. — 1975. — Vol. 31, Jfe 1. — P. 9-16. ***17.*** Schmid, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis // Chemical Mutagens; Principle and Methodes for theur detection. Edited by: A. Hollaende (Plenum, New York). — 1976. — IV, ch. 36. — P. 31-53. *18.* Yamamto, K., Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons // Mutat. Res. — 1980. — Vol. 71. — P. 127-131.

THE INFLUENCE OF TOXOCAROSIS INVASION ON FREQUENCY OF MICRONUCLEUS IN ERYTROCYTES OF WHITE NON-LINED RATS IN MICRONUCLEUS TEST

Stybel V.V., Priyma O.B.
Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytsky

It was determined that invasion of Toxocara canis and its metabolites develop cytogenetic disorders in erythrocytes of white nonlinear rats.

УДК: 619:579:638.154:616-078

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗБУДНИКА АМЕРИКАНСЬКОГО ГНИЛЬЦЮ – КУЛЬТУРИ *PAENIBACILLUS LARVAE SUB. LARVAE*

Ступак Л.П.[1]
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

У статті наведено результати порівняльної оцінки поживних середовищ MYPGP, Томашеца, Уілліса-Гоббза для діагностики і культивування бактерії Paenibacillus larvae sub. larvae.

[1] Науковий керівник – Куцан О.Т., доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент НААН У

Американський гнилець – контагіозне захворювання бджолиного розплоду, збудником якого є стійка спороутворююча бацила *Paenibacillus larvae sub. larvae*. Збудник американського гнильцю дуже вибагливий до компонентів поживних середовищ [1, 2, 3, 4].

Для виділення та зберігання культури *Paenibacillus larvae sub. larvae* О. Ф. Гробовим з співавторами запропоновані наступні середовища: Томашеца (м'ясопептонний сироватковий агар), м'ясопептонний сироватковий бульйон, яєчний агар і бульйон Уайта, кров'яний агар Цейслера, Майкла (на основі екстракту дріжджів) [5]. У лабораторії вивчення хвороб бджіл ННЦ «ІЕКВМ» для індикації та культивування збудника *Paenibacillus larvae sub. larvae* найчастіше використовуються Томашеца та Уілліса-Гоббза (молочно-жовтковий агар), які є простими у приготуванні й зручними у роботі [1, 2].

У процесі постановки діагнозу на американський гнилець розплоду бджіл, одним із діагностичних тестів відповідно до вимог міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ) є виділення чистої культури збудника на середовищі MYPGP [6].

Мета досліджень: провести порівняльну оцінку поживних середовищ для індикації, ідентифікації збудника американського гнильцю, а також подальшого його культивування та зберігання.

Матеріали і методи. Для проведення лабораторних досліджень було використано 8 зразків патологічного матеріалу (шматочків печатного розплоду) та ізоляти, що були отримані з них.

У досліді з вивчення ростових властивостей ізолятів *Paenibacillus larvae sub. larvae* застосовували середовища Томашеца, Уілліса–Гоббза, MYPGP.

Для приготування середовища Томашеца використовували 2 % м'ясо–пептонний агар з додаванням 10 % сироватки коня. Для середовища Уілліса–Гоббза – 60 $см^3$ знежиреного молока після центрифугування за 2500 об/хв. протягом 10 хв. стерилізували за 0,5 атм. 20 хв. у флаконах місткістю 500 $см^3$ з намистинками. До охолодженого молока стерильно додавали один яєчний жовток та 250 $см^3$ 2 % м'ясопептонного агару з pH 6,8-7,0 та температурою не вище 45 ^{0}C, суміш ретельно перемішували до отримання однорідної емульсії і розливали у пробірки над полум'ям горілки. Для виготовлення середовища MYPGP використовували такі компоненти: Мюллер-Хінтон бульйон (бульйону г/$дм^3$: яловичини – 300 г, гідролізат казеїну – 17,5 г, крохмалю – 1,5 г, pH 7,3±0,1) – 10 г, екстракт дріжджів – 15 г, гідрофосфату калію – 3 г, глюкози – 2 г, натрієвої солі піровиноградної кислоти – 1 г, агару – 20 г.

Досліджували вісім зразків патологічного матеріалу. На досліджувані середовища у різних розведеннях наносили завис спор у кількості 0,3 $см^3$ (змив зі стільників, виготовлений на стерильному фізіологічному розчині). Концентрацію спор визначали за оптичним стандартом мутності – 1 млрд мікроб. кл/$см^3$ та розводили у 2, 4, 8, 16, 32 раз. Різні концентрації висівали на чашки Петрі з поживними середовищами. Посіви вирощували у термостаті за температури (37 $\pm$ 0,5) ^{0}C протягом 14 діб.

Результати досліджень. Дані щодо росту ізолятів збудника американського гнильцю із патологічного матеріалу наведені у табл. 1.

Таблиця 1 – Порівняльна оцінка поживних середовищ для індикації збудника американського гнильцю бджіл (на третю добу культивування)

Зразок патологічного матеріалу			*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*
Середовище та концентрація спор у завису з патологічного матеріалу (млн. мікр. кл. /см³),	Томашеца	31,2	–	–	–	–	–	–	–	–
		62,5	–	–	–	–	–	–	–	–
		125	–	–	–	–	–	–	–	–
		250	–	–	–	–	–	–	–	–
		500	+	–	+	–	+	–	+	–
	Уілліса-Гобза	31,2	–	–	–	–	–	–	–	–
		62,5	–	–	–	–	–	–	–	–
		125	+	+	+	+	+	+	+	+
		250	+	+	+	+	+	+	+	+
		500	+	+	+	+	+	+	+	+
	MYPGP	31,2	–	–	–	–	–	–	–	–
		62,5	–	–	–	–	–	–	–	–
		125	–	–	–	–	–	–	–	–
		250	+	–	+	+	+	–	+	+
		500	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітки: 1. "+" – наявність росту; 2. "–" – відсутність росту

Встановлено, що на середовищі Томашеца через 72 год. відмічався незначний ріст збудника американського гнильцю із 1, 3, 5 та 7 зразків патологічного матеріалу і лише за концентрації спор 500 млн мікроб. кл /см³. Ізоляти *Paenibacillus larvae sub. larvae* утворювали дрібні колонії, розміром 1–2 мм у діаметрі, ніжні, спочатку прозорі, потім сіро-білі.

На середовищі Уілліса-Гоббза ріст збудника американського гнильцю з'являвся через 48 годин у всіх зразках патологічного матеріалу у вигляді випуклих колоній у центрі, шорстких з нерівними краями. Як видно із табл.1 ізоляти на цьому середовищі росли із спорового матеріалу у концентрації 125 млн мікроб. кл /см³.

На середовищі MYPGP через 72 год. з'являлися маленькі колонії, округлі, плоскі або випуклі. Ріст ізолятів реєстрували у 6 зразках патологічного матеріалу, окрім 2 та 6 за концентрації спор 250 млн. мікроб. кл. /см³ і вище.

Культурально-морфологічні властивості виділених із патологічного матеріалу ізолятів *Paenibacillus larvae sub. larvae* представлені у табл. 2.

Так, ріст збудника американського гнильцю на середовищі Томашеца з'являвся на третю добу. За період спостереження (14 діб) ми не виявили здатності у 4-х ізолятів *Paenibacillus larvae sub. larvae,* що виросли, утворювати ендоспори. Ізоляти також не утворювали помаранчевий пігмент та не проявляли протеолітичних властивостей (зони лізису навкруги колоній були відсутні). Концентрація мікробних клітин у 1 см³ змиву становила 2-3 млрд /см³ за оптичним стандартом мутності.

Ізоляти *Paenibacillus larvae sub. larvae,* виділені на поживному середовищі Уілліса-Гобза, відрізнялися культурально-морфологічними властивостями. Початок росту ізолятів реєстрували на 2 добу. У всіх випадках колонії були заобарвлені у помаранчевий колір (мікроорганізм утворював пігмент) і було виявлено наявність навкруги колоній зон лізису – просвітлення середовища). На четверту добу реєстрували суцільний ріст мікроорганізмів по всій поверхні чашок Петрі. За мікроскопії забарвлених за методом Грама мазків спостерігали наявність прямих чи злегка вигнутих паличок розміром 2-5 х 0,5-0,7 мкм з заокругленими кінцями, розташованих короткими ланцюжками. Найбільше накопичення бактеріальної маси ізоляту відмічалося на 3-5 добу. Концентрація мікробних клітин у 1 $см^3$ змиву з середовища Уілліса-Гобза становила 8-9 млрд/ $см^3$ за оптичним стандартом мутності. Спороутворення реєстрували на 8-14 добу культивування. У 30 % вегетативних форм спостерігали утворення ендоспор овальної форми розміром 1,2-1,8 х 0,6-0,8 мкм. Середовище Уілліса-Гоббза забезпечувало тривалість збереження ізолятів *Paenibacillus larvae sub. larvae* без додаткових пересівів не менше 1,5 місяці.

Ріст ізолятів *Paenibacillus larvae sub. larvae* на середовищі MYPGP з'являвся на 2-3 добу. Утворення помаранчевого пігменту спостерігали у трьох із восьми ізолятів, наявності зони просвітлення не реєстрували в жодному випадку. Концентрація мікробних клітин у 1 $см^3$ змиву з середовища MYPGP становила 4-5 млрд/ $см^3$ за оптичним стандартом мутності. Спороутворення реєстрували на 10 добу культивування. У 15 % вегетативних форм спостерігали утворення ендоспор овальної форми розміром 1,2-1,8 х 0,6-0,8 мкм.

Отже, ретельний підбір поживного середовища для індикації та ідентифікації збудників гнильцевих хвороб бджіл є запорукою правильного і точного диференційного діагнозу. Зважаючи на те, що *Paenibacillus la rvae sub. larvae* є дуже чутливим та вимогливим мікроорганізмом до селективних поживних середовищ, процес пошуку найкращих з них є постійним та безперервним. Як відомо з літературних джерел [1, 2, 4, 5], цей збудник потребує використання поживних середовищ, збагачених мікроелементами, а також вуглеводними, вітамінними та білковими компонентами. За результатами власних досліджень встановлено, що найбільш відповідає за наявністю поживних речовин середовище Уілліса–Гобза, до складу якого входять молоко та жовток курячого яйця – природні джерела перерахованих корисних компонентів.

Висновки. 1. Для ізоляції та ідентифікації збудника американського гнильцю найкращим виявився молочно-жовтковий агар (середовище Уілліса-Гоббза).

2. Збудник американського гнильцю бджіл – *Paenibacillus larvae sub. larvae* – не зростав за низької концентрації спор у патологічному матеріалі на середовищі MYPGP, не проявляв протеолітичної активності та утворював помаранчевий пігмент у 37,5 % випадків від загальної кількості зразків.

3. У комплексі методів діагностики, як диференційне, молочно–жовтковий агар необхідно застосовувати разом із середовищем MYPGP.

Список літератури

1. Руденко, Е. В. Питательная среда для культивирования возбудителя американского гнильца пчел [Текст] / Е. В. Руденко // Ветеринария. – 1987. – N 2.– С.72-73. ***2.*** Руденко, Е. В. Об особенностях эпизоотологии американского гнильца пчел и его диагностике [Текст] / Е. В. Руденко // Ветеринария: Респ. межвед. тематич. науч. сб.. – К., 1987. – Вып.62. – С.74-76. ***3.*** Basualdo, M. Effect of shaking honey bee colonies affected by American foulbrood on Paenibacillus larvae larvae spore loads [Text] / M. Basualdo; M.L.Del Hoyo; A. Lorenzo // J.apic.Res., 2001; Vol. 40, N 2, – P. 65 – 69. ***4.*** Леонтьева, И. А. Среда для культивирования гнильцов [Текст] / И. А. Леонтьева // Пчеловодство. – 2005 – № 2 С. 30-31 ***5.*** Гробов, О. Ф. Болезни и вредители медоносных Псел [Текст] / О.Ф.Гробов, А.М. Смирнов, Е.Т. Попов. – М. :Агропромиздат, 1987 – с. 62-65. ***6.*** Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) . [Text] / World organization for animal health; OIE. – 2008. – Vol. II, Sect. 2.9. – P. 963–986.

COMPARATIVE ESTIMATION OF NUTRIENT MEDIA FOR THE IDENTIFICATION OF AMERICAN FOULBROOD AGENT – CULTURE *PAENIBACILLUS LARVAE SUB. LARVAE*

Stupak L.P.
National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

Results of comparative estimation of nutrient media MYPGP, Tomashets, Willis-Gobbs for diagnostics and cultivation of bacterium Paenibacillus larvae sub. larvae are presented in the article.

УДК 619:579:616-078

СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ И ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА L-ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕНЫХ ИЗ БИОМАТЕРИАЛА ОТ КРС И КУР

Тарасова Е.В.
ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

В статье представлены результаты изучения сенсибилизирующих и патогенных свойств L-форм микобактерий, выделенных из патологического материала, от реагировавшего на туберкулин крупного рогатого скота и кур, в опытах на морских свинках и кроликах.

В системе профилактики и борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота важное значение имеет своевременная и эффективная диагностика. Основными методами диагностики туберкулеза животных в настоящее время являются аллергический, патологоанатомический и бактериологический метод, по результатам которых определяют эпизоотический статус исследуемого поголовья. Диагноз считается установленным, при обнаружении в органах и лимфатических узлах у животных патологоанатомических изменений характерных для туберкулеза, или при получении положительных результатов бактериологического исследования [3, 7, 6].

Вместе с тем, выделение микобактерий из патологического материала связано с определенными трудностями в силу генетических и фенотипи-