

4. Voronin E.S., Snoz G.V., Vasil'ev M.F. i dr. Klinicheskaya diagnostika s rentgenologiei / pod red. E.S. Voronina. – M.: KolosS, 2006. – S. 432-433.

5. Yanovich V.G., Lagodyuk P.Z. Obmen lipidov u zhivotnykh v ontogeneze. – M.: Agropromizdat, 1991. – 317 s.

6. Jenkins K.J., Griffith G., Kramer J.K.G. (1988) Plasma lipoproteins in neonatal, preruminant, and weaned calves // J. Dairy Sci. – 1988. – Vol. 71. – P. 3003.

7. Korostyleva N.I., Kondrashkova I.S., Rudishina N.M., Kamardina I.A. Biometriya v zhivotnovodstve: uchebnoe posobie. – Barnaul: Izd-vo AGAU, 2009. – 210 s.



УДК 619:616.98:579.873.21:616-076

А.И. Завгородний, С.А. Позмогова, М.А. Гирка
A.I. Zavgorodniy, S.A. Pozmogova, M.A. Girka

**ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ,
БИОХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
ВЫДЕЛЕННЫХ КУЛЬТУР *M. PARATUBERCULOSIS***

**STUDY OF CULTURAL AND MORPHOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL FEATURES
OF ISOLATED CULTURES OF *M. PARATUBERCULOSIS***

Ключевые слова: паратуберкулез, кролики, биоматериал, культивирование, биохимия, микроскопия, *M. paratuberculosis*, референтный штамм, диагностика, возбудитель.

Основным источником возбудителя паратуберкулеза являются клинически и латентно больные животные. Цель работы – выделить культуры микобактерий паратуберкулеза и изучить их культурально-морфологические, биохимические и биологические свойства. Работа проводилась в лаборатории изучения паратуберкулеза ННЦ «ИЭКВМ». Предпосевную обработку отобранных лимфатических узлов проводили по методу Аликаевой. Взвеси биоматериала высевали на яичные среды для культивирования паратуберкулеза. В результате культурального исследования были выделены две медленно растущие культуры микобактерий из мезентериальных лимфатических узлов крупного рогатого скота. Выделенные культуры росли при температуре 37-38°C, не давали роста при 25 и 45°C. В мазках, окрашенных по Циль-Нильсену после 2-3 пассажей, наблюдали прямые, иногда изогнутые с 1-2 зернами на полюсах, разной длины кислотоустойчивые палочки. При изучении ферментативных характеристик изучаемых культур было установлено, что выделенные культуры и референтный штамм отличала относительно низкая каталазная активность. Восстановливали теллурит калия на 14-й день, гидролизировали Твин-80 на 10-й день, а референтный

штамм – на 5-й день. По результатам проведенного исследования установлено, что выделенные культуры и референтный штамм *M. Johnei* 738.V.83 обладают схожими биохимическими характеристиками. Изучение биологических свойств выделенных культур в сравнении с референтным штаммом проводили в опытах на кроликах. Для постановки биологической пробы в качестве лабораторных животных использовали кроликов месячного возраста при внутривенном заражении. На основании результатов сравнительного изучения культурально-морфологических, биохимических и биологических свойств выделенные культуры были отнесены к возбудителю паратуберкулеза.

Keywords: paratuberculosis, rabbits, biomaterial, cultivation, biochemistry, microscopy, *M. paratuberculosis*, reference strain, diagnostics, causative agent.

Clinically and latently diseased animals are the main source of paratuberculosis causative agent. The research goal was to isolate the cultures of *Mycobacterium paratuberculosis* and to investigate their cultural and morphological, biochemical and biological features. The research was conducted at the Paratuberculosis Study Laboratory of the National Research Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine". Pre-inoculation treatment of selected lymph nodes was performed according to

Alikaeva method. Biomaterial suspensions were inoculated in egg media for paratuberculosis cultivation. Two slow-growing cultures of mycobacteria from mesenteric lymph nodes of cattle were isolated. The isolated cultures grew at a temperature of 37-38°C, and did not grow at 25°C and 45°C. Straight, sometimes curved acid-fast rods of different lengths with 1-2 grains at the poles were observed in Ziehl-Neelsen stained smears after 2-3 passages. The study of enzymatic characteristics of the isolated cultures found that the isolated cultures and the reference strain revealed relatively low catalase activity. The isolated cultures restored potassium tellurite

on the 14th day and hydrolyzed Tween 80 on the 10th day, but the reference strain did on 5th day. The study found that the isolated cultures and the reference strain *M. Johnei* 738.V.83 had similar biochemical characteristics. The biological features of the isolated cultures and the reference strain were compared in laboratory rabbits. One-month-old laboratory rabbits with intravenous infection were used for the biological test. Based on the comparative studies of cultural and morphological, biochemical and biological features, the isolated cultures were ranked as causative agents of paratuberculosis.

Завгородний Андрей Иванович, д.в.н., проф., чл.-корр. НААН Украины, зав. отделом изучения туберкулеза и бруцеллеза, Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины, г. Харьков, Украина. E-mail: nikita-h7@mail.ru.

Позмогова Светлана Аркадиевна, к.в.н., вед. н.с., Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины, г. Харьков, Украина. E-mail: nikita-h7@mail.ru.

Гирка Марина Александровна, м.н.с., Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины, г. Харьков, Украина. E-mail: nikita-h7@mail.ru.

Zavgorodniy Andrey Ivanovich, Dr. Vet. Sci., Prof., Head, Tuberculosis and Brucellosis Study Dept., Natl. Research Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine. E-mail: nikita-h7@mail.ru.

Pozmogova Svetlana Arkadiyevna, Cand. Vet. Sci., Leading Staff Scientist, Natl. Research Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine. E-mail: nikita-h7@mail.ru.

Girka Marina Aleksandrovna, Junior Staff Scientist, Natl. Research Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine. E-mail: nikita-h7@mail.ru.

Введение

Основным источником возбудителя паратуберкулеза являются клинически и латентно больные животные. Значение больного или зараженного животного как источника возбудителя паратуберкулеза связано с особенностями выделения микобактерий на разных стадиях инфекционного процесса. Поскольку паратуберкулезная инфекция в большинстве случаев протекает медленно, от нескольких месяцев и до 5-8 лет, без клинического проявления, больные животные вместе с секретами и фекалиями выделяют во внешнюю среду возбудителя паратуберкулеза. Заражение восприимчивых животных происходит алиментарным путем через загрязненные фекальными массами корма, воду, подстилку. В организме животных в процессе развития болезни нарушается гомеостаз, в частности ферментативная, секреторная и всасывающая функции кишечника, а также минеральный, солевой и водный обмен. Все это приводит к интоксикации и истощению организма. Иногда возникает бактериемия [1, 2].

Для профилактики этого заболевания в зарубежных странах в основном рекомендуют соблюдение ветеринарно-санитарных правил, обеспечивающих чистоту на фермах, обеззараживание навоза, правильное и своевременное проведение профилактической дезинфекции и ограничение контактов между дикими и сельскохозяйственными животными, а также молодняка со взрослыми животными.

Но несмотря на проводимые ветеринарные, зоотехнические и хозяйственные мероприятия во многих странах отмечают случаи заболевания и распространения паратуберкулеза среди диких и домашних животных [3-5].

Медленный рост и высокие требования культивирования – одна из причин сложности изучения этого микроорганизма. Также отсутствие лабораторной модели для воспроизведения паратуберкулеза и методики идентификации возбудителя сдерживает разработку более совершенных методов диагностики заболевания [6, 7].

Для выявления больных животных в разные годы разработаны методы прижизненной и лабораторной диагностики. Однако ни один из них в отдельности на ранней стадии инфекционного паратуберкулезного процесса не позволяет выявить инфицированных животных.

Диагноз считают установленным при обнаружении в органах больных животных характерных для паратуберкулеза изменений или при выделении возбудителя из биологического материала.

Эти причины ведут к сложностям при разработке более совершенных специфических средств диагностики и профилактики паратуберкулеза. Исходя из этого усовершенствование методов диагностики этого заболевания остается открытым вопросом.

Поэтому **целью** работы было выделить культуры микобактерий паратуберкулеза и

изучить их культурально-морфологические, биохимические и биологические свойства.

Объекты и методы

Для бактериологического исследования от 10 гол. реагирующего на туберкулины (ППД) крупного рогатого скота были отобраны заглоточные, подчелюстные, бронхиальные, средостенные и мезентериальные лимфатические узлы, а также участки тонкого отдела кишечника.

Предпосевную обработку отобранных лимфатических узлов проводили по методу Аликаевой (5%-ной серной кислотой), пробы кишечника обрабатывали 0,9%-ным раствором N-цетилпиридиния хлористого. Взвеси патологического материала высевали на яичную питательную среду для культивирования микобактерий с добавлением фактора роста (микобактин J), а также на две модифицированные нами среды для выделения и культивирования *M. Paratuberculosis*, в качестве контроля использовали питательную среду для культивирования микобактерий без микобактина. Посевы на питательных средах культивировали в термостате при $(37,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ на протяжении 6 мес. Из выросших на средах культур готовили мазки, которые окрашивали по методу Циль-Нильсена.

У выделенных культур культурально-морфологические свойства изучали на плотных питательных средах с добавлением микобактина, а также на среде без фактора роста.

Биохимические характеристики у выделенных культур исследовали в реакции гидролиза Твин-80, каталазной активности по методу G. Weyne (1962), амидазной активности по (Taegnet A. et al. 1964), устойчивости к салицилату натрия (1000 мкг/мл среды) и толерантности к 5%-ному NaCl (Kestle D. et al. (1976), восстановления теллурита (Kulbum J. et al. (1969).

Кроме этого взвесями выделенных культур заражали кроликов 1-, 6- и 12-месячного возраста в дозе $1,0 \text{ см}^3$ при концентрации бактериальных клеток 2 мг/см^3 стерильного физиологического раствора.

Экспериментальная часть

В результате культурального исследования патологического материала от 2 коров были выделены 2 культуры (№ 9628, № 6830) медленно растущих микобактерий из мезентериальных лимфатических узлов. Причем, на среде без добавления микобактина роста культуры не наблюдали в течение всего периода культивирования. При микроскопии мазков, окрашенных по методу Циль-Нильсена, обнаруживали мелкие зернистые и незернистые кислотоустойчивые палочки, которые располагались скоплениями и реже –

по отдельности. При пересеве взвеси колоний видимый рост субкультуры был установлен через 1,5 мес. только на модифицированной среде для культивирования и на среде с микобатином в виде мелких, непрозрачных, матовых колоний с бугристой поверхностью.

Культура № 9628 была выделена через 5 мес. после посева биоматериала на яичную среду с тусобастин J и на модифицированную нами среду для культивирования *M. paratuberculosis*. При первичном росте культуры № 9628 наблюдали несколько шероховатых, сухих, кремового цвета округлых колоний диаметром 1-2 мм (R-форма). При последующих пересевах на модифицированную яичную среду для культивирования субкультур возбудителя интенсивность и скорость роста колоний увеличились до 12-15 дней. По мере роста на яичных средах колонии образовывали складчатую, ажурную, с неровными краями матовую поверхность. Культура № 9628 и референтный штамм на всех средах росли в R-форме, с поверхности сред колонии легко снимались, имели крошащуюся консистенцию.

Первичный видимый рост колоний культуры № 6830 наблюдали через 4 мес. после посева взвеси мезентериальных лимфоузлов на яичной среде с добавлением микобактина и с экстрактом *M. scrofulaceum* в виде единичных круглых, вначале гладких, но не слизистых, со временем – шероховатых, серобелого цвета. При дальнейших пересевах скорость роста культуры № 6830 была несколько быстрее, чем у референтного штамма и культуры № 9628. По мере роста на картофельной среде колонии культуры № 6830 образовывали бугристую, складчатую поверхность, рост пленки в жидкой части пробирки был значительно интенсивнее, чем у культуры № 9628 и референтного штамма. На яичных средах колонии имели круглую форму, со временем между собой сливались и приобретали суховатую (R-форма) неровную поверхность.

Выделенные культуры в первых пассажах росли только при температуре $37-38^\circ\text{C}$. При дальнейших многократных пересевах субкультуры, а также референтного штамма, скудно росли при температурах 25 и 45°C . На средах с добавлением 5%-ного хлористого натрия роста колоний не наблюдали. Салицилат натрия, добавленный в модифицированную среду для выделения возбудителя паратуберкулеза и среду с микобатином, не ингибировал рост этих культур.

В мазках, окрашенных по Циль-Нильсену, после 2-3 пассажей наблюдали прямые, иногда изогнутые с 1-2 зернами на полюсах, разной длины кислотоустойчивые палочки.

При изучении ферментативных характеристик изучаемых культур было установлено,

что все три культуры отличала относительно низкая каталазная активность (от единичных пузырьков до образования пены высотой 8-10 мм). Культуры № 9628 и № 6830 восстанавливали теллурит калия на 14-й день соответственно, гидролизировали Твин-80 на 10-й день, а референтный штамм – на 5-й день. При определении амидазной активности отличительной чертой всех культур была отрицательная никотинамидазная активность, а с пиразинамидом и карбамидом – положительная, также и у референтного штамма *M. Johnei* 738.V.83.

Изучение биологических свойств у выделенных культур и референтного штамма *M. Johnei* проводили в опытах на кроликах 1-, 6- и 12-месячного возраста путем внутривенного введения взвеси бактериальной массы (2 мг/см³) в дозе 1 см³ двукратно с интервалом 14 дней.

У кроликов месячного возраста, зараженных культурой № 6830 и культурой референтного штамма, наблюдали клинические признаки заболевания через 80 дней после введения культуры, а у зараженных культурой № 9628 – через 95 дней. При клиническом осмотре животные отставали в росте, в сравнении с контрольной группой. За несколько дней до гибели у них отмечали диарею. Фекальные массы имели разжиженную консистенцию зеленовато-желтого цвета с пузырьками газов и слизи. Хвост, живот и задние конечности были загрязнены фекальными массами. На 3-5-й дни после проявления клинических признаков кролики пали. При вскрытии обнаружены патологоанатомические изменения в желудочно-кишечном тракте, в просвете тонкого отдела кишечника слизь бело-желтого цвета, стенка кишечника утолщена. На серозной оболочке кишечника выявляли большое количество мелких узелков, слизистая оболочка имела продольные и поперечные складки. Печень и селезенка увеличены и кровенаполнены. Мезентериальные лимфатические узлы увеличены в 1,5 раза. При микроскопии мазков-отпечатков, сделанных со слизистой оболочки тонкого отдела кишечника, были выявлены кислотоустойчивые палочки. У кроликов 6- и 12-месячного возраста на протяжении 6 мес. клинических признаков, характерных для паратуберкулеза, не выявляли. При патологоанатомическом вскрытии во внутренних органах и желудочно-кишечном тракте характерных для паратуберкулеза изменений не обнаруживали.

Результаты и их обсуждение

Из результатов проведенного исследования установлено, что выделенные культуры и референтный штамм *M. Johnei* 738.V.83 обладают схожими культурально-морфологи-

ческими, биологическими и биохимическими характеристиками.

Выводы

1. На основании результатов сравнительного изучения культурально-морфологических, биохимических и биологических свойств выделенные культуры были отнесены к возбудителю паратуберкулеза.

2. Для постановки биологической пробы в качестве лабораторных животных можно использовать кроликов месячного возраста.

Библиографический список

1. Щуревский В.Е. Паратуберкулез сельскохозяйственных животных. – М.: Колос, 1971. – С. 128.
2. Нигматуллин Т.Г. Минеральный состав сыворотки крови крупного рогатого скота в динамике паратуберкулезного процесса // Труды ВИЭВ. – М, 1962. – Т. 26. – С. 107-114.
3. Collins M.T. Mycobacterium paratuberculosis: a potential food-borne pathogen? // J. Dairy Sci. – 1997. – Vol. 80 (12). – P. 3445-3448.
4. Cocito C., Gilot P., Coene M., de Kesel M., Poupart P., Vannuffel P. Paratuberculosis // Clin. Microb. Rev. – 1994. – Vol. 7 (3). – P. 328-345.
5. Gilmour N.J.L. The pathogenesis, diagnosis and control of Johne's disease // Vet. Rec. – 1976. – Vol. 99. – P. 433-434.
6. Головченко М.В. Адаптация и выращивание культур Mycobacterium paratuberculosis на питательных средах // Ветеринарная патология. – 2006. – № 2. – С. 114-116.
7. Harris N.B., Barletta P. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine // Clin. Microbiol. Rev. – 2001. – Vol. 14 (3). – P. 489-512.

References

1. Shchurevskii V.E. Paratuberkulez sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh. – М.: Kolos, 1971. – С. 128.
2. Nigmatullin T.G. Mineral'nyi sostav syvortki krvi krupnogo rogatogo skota v dinamike paratuberkuleznogo protsessa // Trudy VIEV. – М.: 1962. – Т. 26. – С. 107-114.
3. Collins M.T. Mycobacterium paratuberculosis: a potential food-borne pathogen? // J. Dairy Sci. – 1997. – Vol. 80 (12). – P. 3445-3448.
4. Cocito C., Gilot P., Coene M., de Kesel M., Poupart P., Vannuffel P. Paratuberculosis // Clin. Microb. Rev. – 1994. – Vol. 7 (3). – P. 328-345.
5. Gilmour N.J.L. The pathogenesis, diagnosis and control of Johne's disease // Vet. Rec. – 1976. – Vol. 99. – P. 433-434.

6. Golovchenko M.V. Adaptatsiya i vyrashchivanie kul'tur Mycobacterium paratuberculosis na pitatel'nykh sredakh // Veterinarnaya patologiya. – 2006. – № 2. – S. 114-116.

7. Harris N.B., Barletta P. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine // Clin. Microbiol. Rev – 2001. – Vol. 14 (3) – P. 489-512.



УДК 636.082.2-636.083

И.В. Созинова, Ю.М. Малофеев
I.V. Sozinova, Yu.M. Malofeyev

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У ОВЕЦ ЗАПАДНО-СИБИРСКОЙ МЯСНОЙ ПОРОДЫ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

AMINO-ACID COMPOSITION OF LONGISSIMUS DORSI MUSCLE TISSUE IN SHEEP OF WEST-SIBERIAN MUTTON BREED IN POSTNATAL ONTOGENESIS

Ключевые слова: аминокислоты, длиннейшая мышца спины, овцы, западно-сибирская мясная порода, постнатальный онтогенез.

Изучение морфологических особенностей роста мышечной ткани, её развитие, а также биохимический состав мышц овец в постнатальном онтогенезе является актуальным. Для производства высококачественной молодой баранины была выведена западно-сибирская мясная порода овец (патент № 54176). Необходимость ее выведения обусловлена повышением мясной продуктивности овец, приспособленных к разведению в суровых условиях Сибирского региона. Овцы характеризуются хорошими воспроизводительными качествами, скороспелостью и высоким убойным выходом массы туши в раннем возрасте. Пищевая ценность баранины определяется ее физико-химическими показателями. Цель исследования – изучить аминокислотный состав мышечной ткани на примере длиннейшей мышцы спины у овец западно-сибирской мясной породы в постнатальном онтогенезе. Исследования на аминокислотный состав мышечной ткани проводились в Центральной научно-производственной ветеринарной радиологической лаборатории с помощью аппарата Оптима 7300 DV, МКС-01А «Мультирад» и хроматографа жидкостного «Стайер 2». Качественный белковый показатель определяли по отношению триптофана (как индекса полноценных белков мышечной ткани) к пролину (показателю неполноценных соединительнотканых белков). Нами установлено, что количество триптофана у 12-месячных баранчиков уменьшается на 447,6 мг/кг в сравнении с новорожденными, пролина – на 6493 мг/кг соответственно. Качественный белковый показатель длиннейшей мышцы спины у 12-месячных баранчиков в 2 раза больше по сравнению с новорожденными. Таким образом, качественный белковый показатель, определяющий биологическую ценность мышечной ткани овец, возрастает незначительно в возрастном аспекте. Кроме того, мы определили, что белок мышечной ткани у овец западно-сибирской мясной породы имеет некоторый запас почти всех незаменимых и заменимых аминокислот, причем

уровень этого запаса для различных аминокислот неодинаков. Наибольшей питательной ценностью обладает мясо овец западно-сибирской мясной породы в возрасте 12 мес.

Keywords: amino acids, longissimus dorsi muscle, West-Siberian mutton sheep breed, sheep, postnatal ontogenesis.

The study of morphological features of muscular tissue growth, its development and biochemical composition of sheep muscles in postnatal ontogenesis is a topical issue. West Siberian mutton breed (Zapadno-Sibirskaya myasnaya poroda) of sheep was bred to produce high-quality lamb (Patent No. 54176). The need for that breed was determined by the goal of increasing mutton performance of sheep adapted to the adverse Siberian conditions. Those sheep reveal good reproductive features, and they are fast maturing, and reveal high dressing percentage at early age. The research goal was to study the amino-acid composition of muscular tissue, particularly of longissimus dorsi muscle, of Western Siberian mutton breed in postnatal ontogenesis. The study of the amino-acid composition was conducted with the use of Optima 7300 DV and MKS-01A Multirad spectrometers and Stayer 2 liquid chromatograph. The quality protein quotient was defined by tryptophan (the index of native proteins of muscular tissue) to proline (the index of partial connective-tissue proteins) ratio. It was found that in 12-months hog-lambs the tryptophan content decreased by 447.6 mg kg as compared to newborn lambs, and the proline content by 6495 mg kg respectively. The quality protein quotient of longissimus dorsi muscle in 12-months hog-lambs was two times as much compared to newborn lambs. Thus the quality protein quotient which determines the biological value of sheep muscular tissue insignificantly increases with age. It was found that muscular tissue protein in West Siberian mutton sheep had some reserve of almost all kinds of essential and nonessential amino acids, and that reserve differed for certain amino acids. It is concluded that the mutton of 12-months West Siberian sheep is of the greatest nutritional value.