DOI: 10.48612/sbornik-2026-1-5
УДК 619:579.24/.873.21:636.22/.28

К СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Баратов Магомед Омарович, д-р вет. наук
Прикаспийский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Республики Дагестан», г. Махачкала, Российская Федерация

Проведено исследование ряда питательных сред, а также их модификаций, с целью оптимизации первичного выделения и пересева микобактерий. Сравнительный анализ был проведен для сред Левенштейна-Йенсена и Финна-II в различных вариациях. Установлена практическая значимость сред Левенштейна-Йенсена и Финна-II для первичного выделения возбудителя. Сравнительный анализ показал, что сухая среда Левенштейна-Йенсена демонстрирует лучшие ростовые характеристики по сравнению с нативной средой. Однако, в плане подавления роста посторонней микрофлоры, она значительно уступает нативной среде Финна. Применение н-алканов в качестве стимулятора роста, в дозировке 2–3 капли на 10 мл питательной среды (что эквивалентно 1 капле на 4 мл), привело к сокращению продолжительности культивирования на 15–20 дней и удвоению бактериальной биомассы. Достоверность стимуляции роста *M. bovis* ($P<0,05$) н-алканами на яичных средах по критерию χ^2 подтверждена и результатами вариационной статистики. Выявлены слабые ростовые свойства по отношению к *M. avium* и незначительная стимуляция роста *M. tuberculosis*.

Ключевые слова: туберкулез; питательные среды; микрофлора; ростовые свойства; микобактерии; углеводороды; нативный

TOWARDS IMPROVING LABORATORY DIAGNOSIS OF BOVINE TUBERCULOSIS

Baratov Magomed Omarovich, Dr. Vet. Sci.
Caspian Zonal Research Veterinary Institute – branch of the Federal State Budgetary Institution "Federal Agrarian Scientific Center of the Republic of Dagestan", Makhachkala, Russian Federation

A study of several nutrient media and their modifications was conducted to optimize the primary isolation and subculture of mycobacteria. A comparative analysis was conducted using various variations of Lowenstein-Jensen and Finn-II media. The practical significance of Lowenstein-Jensen and Finn-II media for the primary isolation of the pathogen was established. The comparative analysis revealed that dehydrated Lowenstein-Jensen medium exhibits superior growth characteristics compared to native medium. However, in terms of inhibition of the growth of extraneous microflora, it is significantly inferior to native Finn medium. The use of n-alkanes as a growth stimulant, at a dosage of 2-3 drops per 10 ml of nutrient medium (equivalent to 1 drop per 4 ml), resulted in a 15-20 day reduction in cultivation time and a doubling of bacterial biomass. The significant stimulation of M. bovis growth ($P<0.05$) by n-alkanes in egg media was confirmed by the χ^2 test and the results of the variation statistics. Weak growth properties against M. avium and insignificant stimulation of M. tuberculosis growth were revealed.

Keywords: tuberculosis; nutrient media; microflora; growth properties; mycobacteria; hydrocarbons; native

В настоящее время диагностика является основой борьбы с туберкулезом животных. Лабораторные методы играют ведущую роль в уточнении диагноза, поскольку основной прижизненный метод – аллергическая туберкулиновая проба – не является совершенным из-за многочисленных неспецифических реакций, вызывающих аллергию [1, 10].

Следует подчеркнуть и низкую специфичность патологоанатомического метода,

особенно на ранних стадиях туберкулеза. Единственный характерный признак – туберкула – становится визуально заметным, как правило, лишь при генерализованных формах [4].

Критерием для дифференциации микобактерий туберкулеза от близкородственных таксонов служат исключительно данные лабораторных методов, которые достаточно чувствительны и специфичны для обнаружения генетических различий возбудителя. В рамках лабораторной диагностики, одним из важнейших шагов является успешное выделение микобактерий путем его посева на специальные питательные среды [5, 8].

В то же время, несмотря на многочисленные работы по определению результативности предложенных питательных сред, многие аспекты выделения микобактерий требуют дополнительного изучения. К причинам, определяющим трудности лабораторной диагностики, относятся, в первую очередь, слабые ростовые свойства предложенных сред, приводящие к длительным срокам культивирования [2].

Из целого ряда известных плотных питательных сред для изолирования микобактерий на яичной основе наиболее признанными являются среды Левенштейна-Йенсена и Финна-II [3].

Работая над усовершенствованием питательных сред, Э. Р. Финн (1976), предложил удачную безаспарагиновую среду, где в качестве источника азота использован глутаминовокислый натрий [6].

В 1980 году А. И. Алиев и Н. Г. Фадеева успешно усовершенствовали культуральные характеристики модифицированной ими среды Финна-II, что способствовало более эффективному первичному выделению *M. paratuberculosis*. Последующие исследования подтвердили превосходство разработанной ими среды и в процессе выделения возбудителя туберкулеза животных [2, 7].

При изучении замороженных, нативных, а также высушенных форм сред Левенштейна-Йенсена и Финна-II, Т. И. Козулицына, Н. М. Макаревич, Е. А. Финкель и др. (1985), установили, что замораживание среды Левенштейна-Йенсена повышает ее качество, среда Финна-II – лучше нативная, лиофилизированная среда Левенштейна-Йенсена не уступает нативной среде Финна-II [3, 9].

О возможности получения роста *M. tuberculosis* в течение 5 дней на агаровой среде с жидким парафином сообщили Т. В. Коронелли и Н. И. Федеева (1986) [1].

По данным Р. А. Нуратинова с соав. (1998, 2001, 2003 гг.), внесение дрожжевого аутолизата и смеси н-алканов в среду Финна-II ускоряет появление первичной генерации на 15–20 суток раньше аналога, а добавление картофельного экстракта повышает частоту индикации и скорость роста при посевах гомогенатов биоматериала.

Исследования Р. А. Нуратинова и его коллег (1998, 2001, 2003 гг.), показали, что обогащение среды Финна-II дрожжевым аутолизатом и смесью н-алканов приводит к ускорению появления первичной генерации на 15–20 суток по сравнению с контролем. Кроме того, добавление картофельного экстракта способствует более частой индикации и интенсивному росту при инокуляции гомогенатов биоматериала.

Настоящая работа посвящена сравнительному изучению высеваемости и ростовых свойств наиболее часто используемых питательных сред и их модификаций, для изолирования микобактерий.

Методика исследований. Для первичного выделения и пересева микобактерий был проведен сравнительный анализ эффективности ряда питательных сред по прописи Петраньяни, Герольда, Евглевского, Мордовского, Павловского, а также Левенштейна-Йенсена, Финна-II и их модификации. Результаты показали, что среды Левенштейна-Йенсена и Финна-II демонстрируют наилучшие показатели для первичного выделения микобактерий. Тем не менее, практическое применение среды Финна-II в бактериологических исследованиях ограничено из-за дефицита ключевого компонента – натрия глутамата.

С целью замены *протеиногенных аминокислот, входящих в состав белков, натрий глутамат однозамещенный заменили гликоколем* (*амидоуксусная кислота)* в той же дозе. Модификацию среды по прописи автора (Е. С. Чичибабина, 1987), проводили, сохраняя пропорцию между яичной массой и минеральными солями. Солевые компоненты готовили по описанной ранее технологии, растворяли в половинном количестве дистиллированной воды и добавляли такое же количество картофельного экстракта. Предлагаемый алгоритм показал хорошие результаты по высева-

емости и скорости роста микобактерий в сравнении со средой Финна-II, в авторской прописи. Картофельный экстракт добавляли в модифицированную Чичибабиным Е.С. среду, в количестве 15 г.

В сравнительном плане были изучены среды Левенштейна-Йенсена и Финна-II в различных вариантах: Левенштейна-Йенсена, приготовленная по прописи авторов и замороженная в течение 1 и 14 суток; Левенштейна-Йенсена, сухая и замороженная в течение 1 и 14 суток; Финна-II в авторском варианте и четырех модификациях, АФ-I в модификации Е. С. Чичибабина (гликоколь вместо глутамата натрия), АФ-II – модифицированная А. И. Алиевым и Н. Г. Фадееевой (с картофельным экстрактом), АФ-III – (без гликоколя) и вариант «МФ» (с экстрактом *M. flei*).

Посевы производили из биоматериала больной туберкулезом коровы и материала, искусственно инфицированного M. bovis, предпосевную обработку проводили по методу А. П. Аликаевой. Во второй серии опытов из каждой пробы засевали по 5 пробирок.

Оптимальное количество н-алканов определяли нанесением на скошенную поверхность среды АФ-I 1,2,4 и 6 капель, 5 пробирок засевали в качестве контроля без н-алканов.

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе первого эксперимента было проведено тестирование пяти различных питательных сред. Наиболее эффективными для культивирования микобактерий из патологического материала оказались следующие: среда Финна-II в модификации А. И. Алиева и Н. Г. Фадеевой (АФ-II), на которой визуально определяемый рост наблюдался в период с 20 по 25 день; сухая среда Левенштейна-Йенсена, показавшая рост на 26–30 дни; нативная среда Финна-II, где рост был отмечен на 28–33 дни; и среда Левенштейна-Йенсена, на которой рост проявился в интервале 35–45 дней.

Аналогичные результаты получены при посевах искусственно обсемененного материала, но на 3–4 дня раньше.

Во второй серии опытов использовали девять различных вариантов сред, опыты повторялись не менее пяти раз. Лучшие результаты удалось получить на среде Финна-II в модификациях (АФ-I и АФ-II), а также варианте МФ. Рост *M. bovis* на варианте МФ сильно зависит от качества яиц. На сухой среде Левенштейна-Йенсена рост был лучше, чем на нативной. Эта среда не уступала по скорости роста нативной среде Финна, но значительно уступала по устойчивости к прорастанию посторонней микрофлорой, что имеет существенное значение в лабораторной диагностике (таблица 1).

Основываясь на сообщении Т. В. Коронелли и Н. И. Фадеевой, которым, по их данным, удалось получить обильный рост микобактерий туберкулеза за 3–5 дней на среде с жидким парафином, мы пытались воспроизвести эти опыты. Т. В. Коронелли и Н. И. Фадеева использовали в своих опытах смесь нормальных н-алканов от додекана до октадекана, т.е. от C_{12} до C_{18}. В связи с этим, представлялось необходимым качественное изучение возможности ускорения ростовых свойств углеводородами. Для этого мы использовали смесь н-алканов с более широким диапазоном содержания молекул углевода – от декана до нонадекана (от C_{10} до C_{22}).

Провели пять серий опытов, в которых, наряду со средой по прописи авторов, испытано 30 разных вариантов: с добавлением различного количества жидкого парафина; спиртового экстракта *M. flei*; растворов воска; прополиса на гексане; добавлением 5–10 %-ной сыворотки крупного рогатого скота; использованием водопроводной и морской воды; посевом разных количеств микробных тел и другие.

В результате в отдельных пробирках со средой по прописи авторов и с добавлением спиртового экстракта *M. flei* на 5–7 дни посева получен трудно различимый невооруженным глазом рост *M. bovis*. Эти колонии еще продолжали увеличиваться до 10–12 дней. Но рост был настолько скудным, что культуру невозможно практически использовать.

Оценку стимуляции роста *M. bovis* н-алканами на яичных средах проводили изучением тестов: влияние на рост микобактерий замены глицерина н-алканами; влияние добавления н-алканов до и после стерилизации в разных дозах; влияние н-алканов на рост других видов микобактерий; влияние на рост микобактерий других углеводов (тридекана).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика роста *M. bovis* на различных питательных средах

Наименование сред	Варианты и их обозначение	Посев патматериала									Посев культуры						
		Засеяно пробирок	Начало роста в днях	% проста	Оценка роста по 7 балльной системе через……дней						Засеяно пробирок	Начало роста в днях	Оценка роста по 7 балльной системе через….. дней				
					20	25	30	40	50	60			20	25	30	40	50
Левенштейна-Йенсена	Нативная	320*	35-45	1-5	0	0,36	0,41	1,06	2	1,01	150*	20-25	0,42	0,74	1,28	2,0	2,42
Левенштейна-Йенсена	Нативная заморожен	16	30-40	40	0,1	0,4	0,45	1,7	2,3	2,4	0	–	–	–	–	–	–
Левенштейна-Йенсена	Сухая	35	26-30	30	0	0,35	0,42	1,7	2,5	2,6	16	10-15	0,47	0,8	1.3	2,12	3,01
Левенштейна-Йенсена	Сухая заморожен	16	–	100	–	–	–	–	–	–	16	9-15	0,6	1,07	1,6	2,4	3,3
Финна-II	По автору	150*	28-33	1-5	0,16	0,6	0,75	1,25	2,3	2,4	50	11-18	0,9	1,03	1,56	1,38	3,25
Финна-II модиф.	Вариант АФ-I	1650*	20-25	1-5	0,2	1,3	2,05	3,0	3,2	3,5	250*	10-15	1,1	1,9	2,3	3,3	4,2
Финна-II модиф	Вариант АФ-II	50	20-25	1-5	0,5	1,0	2,1	2,8	3,5	4,0	50	10-15	0,8	1,3	2,4	3,42	4,5
Финна-II модиф.	Вариант АФ-III	10	29-40	–	–	–	0,6	1,2	2,0	2,0	0	–	–	–	–	–	–
Финна-II модиф.	Вариант МФ	50	20-25	1,5	0,8	1,1	1,9	2,6	3,55	4,0	50	10-15	0,91	1,5	2,3	3,1	4,0

Примечание: * –указано общее количество посевов за 2019-2025 годы.

При замене глицерина жидким парафином в модифицированной среде Финна (АФ-I) появление первых колоний отмечено на 6–8 дни после посева, т.е. на 3–4 дня раньше, чем на среде с глицерином. Результаты совпадают с полученными в последующем данными по испытанию влияния смеси н-алканов на рост *M. bovis* на скошенной поверхности сред Левенштейна-Йенсена, Финна-II, АФ-II, АФ-III и варианте «МФ».

На поверхность среды добавляли по 1 капле смеси н-алканов и ставили горизонтально на 1–2 суток, затем производили посев культурой *M. bovis*, изолированной от животных. Увеличение бактериальной массы 136 до 209 %, в среднем на 163 %, явилось показателем выраженных ростовых свойств н-алканов (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели стимуляции роста *M. bovis* на яичных питательных средах

Срок культивирования (дни)	Питательная среда	Среднее количество баллов				
		Левенштейна-Йенсена	Финна-II	АФ-II	АФ-III	«МФ»
35	Без н-алканов	3,25±0,22	4,10±0,34	4,15±0,34	3,85±0,1	2,7±0,2
	с н-алканами	5,25±0,18	5,6±0,12	5,86±0,23	5,65±0,16	5,65±0,1
	%	159	135,5	139,7	146	209
50	Без н-алканов	3,6±0,16	4,4±0,16	4,45±0,22	4,5±0,13	3,45±0,11
	с н-алканами	5,8±0,29	6,45±0,16	6,55±0,25	6,2±0,17	6,5±0,166
	%	161	146,5	147,1	137,7	192

На средах с добавлением н-алканов после 25-дневного культивирования получен рост микобактерий бычьего вида, аналогичный количеству бактериальной массы, полученному на тех же средах без углеводородов через 40-45 дней. В результате вариации компонентов удалось сократить сроки культивирования на 15-20 дней и увеличить бактериальную массу примерно в 2 раза.

Достоверность стимуляции роста *M. bovis* ($P<0,05$) н-алканами на яичных средах по критерию χ^2 подтверждена и результатами вариационной статистики.

Исследования по изучению влияния оптимального количества н-алканов на рост M. bovis показали результативность 2–3 капель на 10 мл питательной среды (1 капля на 4 мл среды). Выявлены слабые ростовые свойства по отношению к *M. avium* и незначительная стимуляция роста *M. tuberculosis*.

Выводы.

1. Модифицированная А. И. Алиевым и Н. Г. Фадеевой среда (АФ-II), обогащенная картофельным экстрактом, показала более высокую высеваемость и ускоренный рост, чем исходный вариант.

2. При посевах биоматериала визуально заметный рост *M. bovis* на модифицированной среде Финна-II отмечали на 20–25 дни, Левенштейна-Йенсена (сухой) – 26–30, исходной среде Финна-II – 28–33 дни.

3. Значительное улучшение показателей роста и сокращение сроков культивирования M. bovis достигается путем обогащения яичных питательных сред смесью нормальных н-алканов (C10–C22). Оптимальный эффект наблюдается при добавлении одной капли смеси на 4 мл среды непосредственно перед стерилизацией.

4. Среда «МФ» с экстрактом *M. flei* значительно уступает по выходу бактериальной массы среде в авторской прописи, но превосходит ее по скорости роста. Серьезным недостатком этой среды был неодинаковый рост в пробирках одного варианта среды. Изучение этой среды следует продолжить.

Список литературы

1. Баратов М. О. Неспецифические реакции – проблема диагностики туберкулеза животных / М. О. Баратов // Ветеринария и кормление. – 2020. – № 4. – С. 16–18.

2. Баратов М. О. К поиску причин сенсибилизации крупного рогатого скота к ППД-туберкулину для млекопитающих / М. О. Баратов, П. С. Гусейнова // Ветеринария сегодня. – 2021. – № 4 (39). – С. 271–276.

3. Белобородова А. А. Повышение эффективности лабораторной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота : автореф. дис. ... канд. вет. наук / А. А. Белобородова. – Новосибирск, 2008. – 18 с.

4. Воробьева З. Г. Экспресс-диагностика туберкулеза крупного рогатого скота / З. Г. Воробьева, А. Л. Лазовская, К. Н. Слинина // Ветеринарная патология. – 2004. – № 1–2 (9). – С. 126–127.

5. Гусейнова П. С. Сравнительное изучение методов диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / П. С. Гусейнова, М. О. Баратов // Ветеринария и кормление. – 2020. – № 4. – С. 24–26.

6. Донченко Н. А. Усовершенствование средств и методов диагностики и профилактики туберкулеза крупного рогатого скота : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.03 ; 16.00.04 / Н. А. Донченко. – Новосибирск, 2008. – 36 с.

7. Ионина С. В. Повышение диагностической эффективности питательных сред для культивирования микобактерий туберкулеза : автореф. дис. ... канд. биол. наук / С. В. Ионина. – Новосибирск, 2001. – 18 с.

8. Дурыманов А. Г. Метод культивирования микроорганизмов Mycobacterium tuberculosis / А. Г. Дурыманов, Ю. Н. Рассадкин, А. Ю. Алексеев. – Патент РФ № 2209829 // Бюллетень изобретений. – 2003. – № 22.

9. Муковнин А. А. Туберкулез крупного рогатого скота в России / А. А. Муковнин, А. Х. Найманов, А. М. Гулюкин // Ветеринария. – 2020. – № 7. – С. 19–23.

10. Найманов А. Х. Сравнительная оценка прижизненных методов диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / А. Х. Найманов // Ветеринария. – 2009. – № 2. – С. 7–13.