

УДК 619: 616.995.636

ПРОВЕДЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ КУЛЬТУР МИКОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИ ИЗУЧЕНИИ МИКОБАКТЕРИОФАГОВ

Сырым Назым Сырымкызы, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»,

*Еспембетов Болат Аманбаевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией микробиологии РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»,
Конбаева Гулшат Макседовна, магистрант лаборатории микробиологии РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»,*

Серікбай Елдос Бухарбекулы, лаборант лаборатории микробиологии РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»

Республика Казахстан, РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (НИИПББ)

*080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский
e-mail: ribs@srai.kz*

Ключевые слова: *Mycobacterium*, туберкулез, микобактериофаг, объекты внешней среды, биологический материал.

В статье представлены результаты исследований, по проведению полного биологического контроля коллекционных культур микобактерий для подтверждения исходных типовых свойств с целью их дальнейшего использования при изучении микобактериофагов (МБфагов)

Введение. В настоящее время эпидситуация по туберкулезу характеризуется, резким увеличением частоты лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к вновь создаваемым противотуберкулезным препаратам, что требует поиска принципиально иных способов элиминации возбудителя туберкулеза из инфицированного организма. Одним из наиболее перспективных подходов является использование естественных антагонистов *Mycobacterium*, каковыми являются литические МБфагов [1, 2].

Для получения МБфагов используют индикаторные тест-культуры, которые судят по их отсутствию роста о наличии фага. С помощью подобранных индикаторных тест-культур удается обнаруживать фаги. Взаимоотношения между фагом и чувствительной к нему клеткой очень сложны и не всегда завершаются лизисом клетки и размножением в ней фага [3-6].

В связи с этим, тест-культуры микобактерий также имеет большое значение при выделении и изучении МБфагов. В начале опыта много внимания уделялось по проведению полного биологического контроля коллекционных культур микобактерий для подтверждения исходных типовых свойств.

Объекты и методы исследований. Для выполнения исследований в качестве индикаторных тест-культур были использованы атипичные культуры микобактерий: *M. kansasii*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. phlei*, *M. terrae*, *M. intracellulare*, *M. Smegmatis*, *M. bovis-8*, *M. tuberculosis H₃₇Rv*.

Для культивирования микобактерий использована стандартная питательная среда Левенштейна-Йенсена, как наиболее часто используемая в бактериологической диагностике туберкулеза. Данная питательная среда с добавлением яичной эмульсии используется для выращивания микобактерий и выделения чистой культуры.

Были использованы культуральный метод, биологическая проба и полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Результаты исследований. В начале опыта нами были выбраны и освежены индикаторные тест-культуры микобактерий для обогащения и проверки специфичности литического действия при выделении МБфагов.

У тест-культур были изучены: сроки обнаружения первичного роста, характеристика колоний, пигментообразование, тинкториальные свойства при окраске по Циль-Нильсену, биохимические свойства (каталаза и пероксидаза), лекарственная чувствительность микобактерий, для дифференциации их использованы амиды – ацетамид, мочевины, никотинамид, пиразинамид, алантоин, сукцинамид, а также метод ПЦР и биологическая проба.

Далее, указанные культуры исследовали биохимическими методами. В окислительно-восстановительных процессах микробной клетки активное участие принимают такие ферменты, как каталаза и пероксидаза.

В результате у исследованных культур микобактерий активность этих ферментов была резко понижена, колонии оставались бесцветными, отсутствовало выделение пузырьков газа.

Также проведены исследования с применением салицилово-кислого натрия. Лекарственную чувствительность культур микобактерий определяли непрямым путем (таблица 1).

Для изучения биохимических свойств имеющихся культур микобактерий туберкулеза использовали 6 амидов – ацетамид, мочевины, никотинамид, пиразинамид, алантоин, сукцинамид.

Таблица 1 - Чувствительность культур микобактерий к изониазиду

Микобактерий	Разведение изониазида на среде Левенштейна-Йенсена		
	2500 мкг/мл	500 мкг/мл	100 мкг/мл
<i>M. bovis</i> -8	–	–	–
<i>M. kansasii</i>	+	++	+
<i>M. avium</i>	–	–	–
<i>M. avium</i>	–	–	–
<i>M. avium</i> -780	–	–	–
<i>M. terrae</i>	+	+	+
<i>M. scrofulaceum</i>	+	+	+
<i>M. intracellulareae</i>	+	+	+
<i>M. phlei</i>	+	+	+
<i>M. H₃₇Rv</i>	–	–	–

Примечание: «–» – отсутствие роста культуры; «+» – более 50 колоний

Таблица 2 – Результаты биохимических реакций микобактерий на амиды.

№ п/п	Амиды	<i>M. bovis</i> -8	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> -780	<i>M. terrae</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. phley</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. intracellulareae</i>	<i>M. H₃₇Rv</i>	<i>M. bovis</i> -БЦЖ
1	Ацетамид	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	Мочевина	+	–	–	–	+	+	+	–	+	+
3	Никотинамид	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–
4	Пиразинамид	–	+	+	+	–	+	+	+	+	–
5	Сукцинамид	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	Алантион	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: «+» – положительная реакция;
«–» – отрицательная реакция.

Результаты биохимических реакций эталонных и эпизоотических штаммов на амиды приведены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, при проведении определения амидазной активности коллекционных культур микобактерий оказалось, что культуры стабильно сохранили свои типовые исходные биохимические свойства.

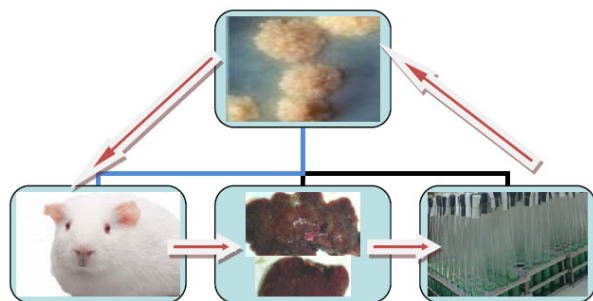


Рисунок 1 - Схема проведения биологической пробы

После освежения и подтверждения исходных типовых свойств коллекционных культур микобактерий было проведено тестирование их биологической пробой. Эксперимент выполнен на 10 морских свинках массой 300-350 г.

Схема постановки биологической пробы представлена на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1, схема проведения биологической пробы выглядит таким образом: 1 - приготовление взвеси культур микобактерий; 2 – заражение морских свинок исследуемыми культурами; 3 – убой, проведения вскрытия для отбора проб; 4 - проведения бактериологического исследования.

Через 30 дней были взяты пробы крови из сердца морских свинок в объеме 3 – 4 см³. После проведения вскрытия от каждого животного были взяты паховые лимфатические узлы, печень, легкие, почки, селезенка для проведения бактериологического исследования. Посевной материал (кроме проб крови) были подвергнуты предпосевной обработке по общепринятому методу (Аликаевой) и высеяны на среду Левенштейна-Йенсена.

Посевы культивированы в термостате при температуре 37 °С в течение 30-45 суток. Учет результатов проведен путем подсчета колоний, выросших на питательной среде (рисунок 2).

Результаты проведенной биологической пробы и патолого-анатомического вскрытия на лабораторных животных зараженных вирулентными культурами (*M. bovis*-8 и *M. tuberculosis* H₃₇Rv) показали генерализованный туберкулез. Далее были проведены убой и исследования проб биоматериала от морских свинок, сенсibilизированных атипичными микобактериями (*M.kansasii*, *M.avium*, *M.scrofulaceum* *M.avium*-780, *M.phlei*, *M.terrae*, БЦЖ, *M.intracellulare*) из которых были

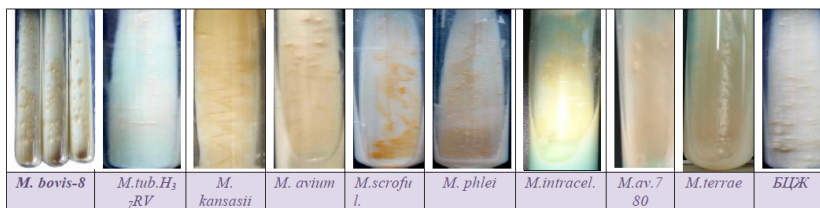


Рисунок 2 - Выросшие культуры микобактерий на среде Левенштейна-Йенсена

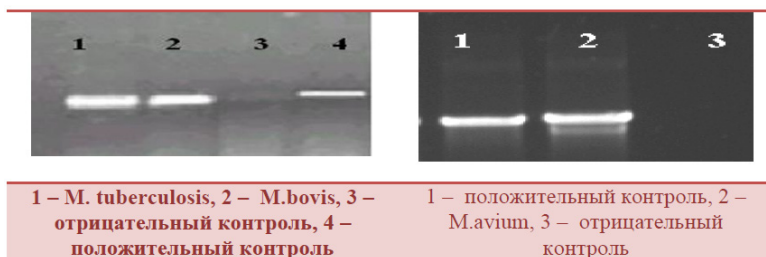


Рисунок 3 - Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации ДНК микобактерий

получены культуры выше указанных видов микобактерий. По результатам контрольного посева патологического материала полученных от зараженных вирулентными культурами микобактерий на питательную среду Левенштейна-Йенсена на 20 – 36-е сутки так же были отмечены рост культур *M. bovis-8* и *M. tuberculosis H₃₇Rv* (рисунок 2).

В результате проведения биологической пробы из исследованных проб патологического материала были выделены культуры, соответствующие культурально-морфологическим свойствам исходных культур микобактерий туберкулеза.

Пробы крови, взятые перед убоем из сердца морских свинок и выделенные изоляты от их органов подвергались подтверждению методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью наборов «МТБ-КОМ» предназначенного для выявления ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*) и «АВИУМ» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора выявляемых в культурах микроорганизмов, а также в различном биологическом материале.

Согласно рисунку 3, в пробах под номерами 1, 2 наблюдаются специфические полосы размером 390 пар нуклеотидов. Мы получили молекулярно-генетическое подтверждение соответствия изолятов, выделенных от морских свинок, штаммам, которыми ранее проводили заражение данных животных. Далее нами было получено подтверждение методом ПЦР, изолята *Mycobacterium avium*, выделенного от морской свинки после заражения. Исследование проводили с помощью набора «АВИУМ» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Как видно на рисунке 2, изолят, выделенный от морской свинки, соответствует *M. avium*.

Таким образом, были освежены коллекционные культуры микобактерий – *M. bovis*-8, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. scrofulaceum* *M. avium*-780, *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. phlei*, *M. terrae*, штамм БЦЖ, *M. intracellulare*. Результаты изучения культурально-морфологических и биохимических свойств показали, что у коллекционных культур наблюдается однородный, достаточный рост колоний. Наличие роста свидетельствовало о жизнеспособности культур, их стабильности, а также исходные типовые свойства выше указанных штаммов подтверждены с помощью ПЦР и биологической пробой.

Выводы. Проведен биологический контроль и все вышеперечисленные коллекционные культуры микобактерий после освежения сохранили свои исходные типовые свойства и данные культуры будут использованы в качестве индикаторных тест - культур при изучении МБфагов.

Библиографический список

1. Broxmeyer L, Sosnowska D, Miltner E, Chacon O, Wagner D, et al. (2002) Killing of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent mycobacterium: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens. *J Infect Dis* 186:1155–1160 [[PubMed](#)].
2. Elizabeth Kutter Phage therapy: Bacteriophages as antibiotics, Evergreen State College, Olympia, WA 98505 – Nov. 15, 1997.
3. Сырым Н.С., Еспембетов Б.А., Сансызбай А.Р. Новые подходы в терапии туберкулеза // *Материалы VIII съезда фтизиатров и пульмонологов Узбекистана*. Ташкент, 2015. –Стр. 137-138.
4. Сырым Н.С., Еспембетов Б.А. Разработка метода получения микобактериофага // *Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности»*, посвященной 80-летию заслуженного ученого, профессора В.Л.Зайцева, 13 июля 2015. – С.272-276.

5. Васильев, Д.А. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №4 (24). - С. 36-43.
6. Романова, Н.А. Сравнительная эффективность методов выделения фагов *Bacillusmegaterium* / Н.А. Романова, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев [и др.] // Вестник ветеринарии. – 2013. - № 1 (64). – С. 26-27.

THE USE OF BIOLOGICAL CONTROL CULTURES OF MYCOBACTERIA FOR USE IN THE STUDY OF MYCOBACTERIOPHAGES

Keywords: *Mycobacterium, tuberculosis, mycobacteriophage (MBphage), the objects of the environment, biological material.*

The article presents the results of research for the complete collection of biological control of mycobacteria cultures to confirm the source of typical properties for the purpose of their further use in the study of mycobacteriophage (MBphage).