

Елекеев Т.А., Сырым Н.С., Акматова Э.К., Конбаева Г.М.

**АНТИГЕН АЛУУ ҮЧҮН МИКОБАКТЕРИЯЛАРДЫН КУЛЬТУРАСЫН
КОЛДОНУУГА БИОЛОГИЯЛЫК КОНТРОЛДОО**

Елекеев Т.А., Сырым Н.С., Акматова Э.К., Конбаева Г.М.

**БИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КУЛЬТУР МИКОБАКТЕРИЙ ДЛЯ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ АНТИГЕНА**

T.A. Elekeev, N.S. Syrym, E.K. Akmatova, G.M. Konbaeva

BIOLOGICAL CONTROL OF MIKOBACTERI CULTURES FOR USE ON ANTIGEN

УДК: 619: 616.995.636

Макалада толугу менен биологиялык бир антигенге микобактериялардын маданий M. bovis, M. avium баштапкы касиеттерин тастыктоо үчүн контроль жүргүзүлдү.

Негизги сөздөр: кургак учук, биологиялык үлгү, микобактериялардын культураны, антиген.

В статье был проведен полный биологический контроль для подтверждения исходных свойств культур микобактерий M. bovis, M. avium для получения из них антигена.

Ключевые слова: туберкулез, биологическая проба, культура микобактерий, антиген.

A complete biological control was conducted to confirm the initial properties of M. bovis and M. avium mycobacteria cultures to obtain antigen from them.

Key words: tuberculosis, biological test, cultures of mycobacteria, antigen.

Введение

Но, вследствие того, что микобактерии туберкулеза относятся к медленно растущим микроорганизмам (вегетативное деление каждой из клеток микобактерий происходит за 14-18 часов, сроки постановки первичного диагноза на туберкулез бактериологическим методом увеличиваются до 3 месяцев [1]. В последнее время для диагностики инфекционных заболеваний стала широко применяться полимеразная цепная реакция (ПЦР), но из-за высокой стоимости оборудования и себестоимости проводимых анализов ПЦР не получила широкого распространения [2]. В связи с этим, целью настоящей работы является провести биологический контроль культур микобактерий при получении антигена для диагностики туберкулеза животных.

Материалы и методы исследований

Для выполнения исследований культуры M. bovis и M. avium будут использованы при приготовлении антигена для ККРА. Для этого были использованы культуральный метод, биологическая проба и ПЦР.

Для культивирования микобактерий использована питательная среда Левенштейна-Йенсена.

Результаты исследований

У культур изучали сроки обнаружения первичного роста (при разных температурных режимах: 22, 28, 37, 45 и 52 °С), характеристику колоний, пигментообразование, тинкториальные свойства при окраске по Циль-Нильсену. Колонии культуры пересеивали на пробирки со средой Левенштейна-Йенсена и помещали в термостаты с температурой 20-22 °С (комнатная температура), 37-38 и 45 °С. Посевы просматривали на 3, 5, 10 и 20-е сутки. В результате M. bovis выросли при температуре +37-+38 °С через 25-30 сут, а M. avium через 10-15 сут при 20-22 (+/-), 37-38 и 45 °С.

Далее указанные культуры исследовали на каталазную и пероксидазную активность. 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. Данный тест используется как один из основных биохимических методов дифференциации M. tuberculosis и атипичных микобактерий. Проводили посев на питательную среду с содержанием салицилово-кислого натрия, а для контроля брали часть среды без каких-либо добавлений. Культуральную взвесь с добавленными препаратами вносили по 0,2 см³ в 10 пробирок с обычной средой и по две пробирки на среду, содержащую 1 мг/см³ салицилово-кислого натрия. Пробирки со средой с препаратом инкубировали при 37-38°С. Наблюдение проводили в течение 30 дней.

В результате при испытании M. bovis-8 не давали рост на среде с салицилово-кислым натрием при 37°С, в то же время M. avium давали пышный рост.

Лекарственную чувствительность культур микобактерий определяли не прямым путем. Тестируемые культуры высевали на плотную питательную среду Левенштейна-Йенсена, содержащую изониазид в концентрации 1 мкг/мл, который был добавлен непосредственно в среду перед обработкой в

Apparatus for coagulation nutrient media ASPS-01 (ASIS). Снятую со среды культуры микобактерий взвешивали по 5 мг/мл, в последующем доводили ее концентрацию физиологическим раствором до содержания микробов 1 мг/см³. В итоге в среду засеивали по 0,2 см³ суспензии исследуемой культуры, приготовленной, как указано выше. Пробирки выдерживали в термостате при 37°C в течение 48 час в горизонтальном положении, после чего ложили в штатив; инкубацию проводили при 37°C в течение 28-30 сут. Результаты учитывали по истечении определенного срока выращивания, достаточного для получения обильного роста микобактерий в контрольных пробирках. Чувствительными к изониазиду оказались *M. bovis* и *M. avium*.

Для изучения биохимических свойств имеющих культур микобактерий туберкулеза готовили синтетическую агаровую среду: пептон – 2 г, агар-агар – 40 г, NaCl – 10 г, глюкоза – 2 г, K₂HPO₄ – 4 г, глицерин – 20 см³, дистиллированная вода – до 2000 см³. Среду разливали по 5 см³ в бактериологические пробирки, автоклавировали при 120°C в течение 20 мин и остужали в наклонном положении.

При дифференциации культур микобактерий использовали 6 амидов – ацетамид, мочевины, никотинамид, пиразинамид, алантоин, сукцинамид. Амиды растворяли в дистиллированной воде, стерилизовали нагреванием до 100 °С в течение 30 мин, мочевины стерилизовали через фильтр Зейтца. Растворы амидов наносили на поверхность среды в стерильных условиях и давали впитаться, оставляя пробирки в наклонном положении в течение 2-3 суток. Концентрация амидов в исходном растворе должна быть: ацетамида, мочевины – 40 мг/см³, никотинамида – 30 мг/см³, пиразинамида – 20 мг/см³, сукцинамида – 15 мг/см, алантоина – 10 мг/см³. При этом растворы в пробирках, соответственно, первых четырех амидов – по 0,25 см³, в двух оставшихся – по 1 см³. На синтетическую среду – с амидами и контрольную – без амидов засеивали по 0,2 см³ взвеси микобактерий на физиологическом растворе, в концентрации 1 мг/см³. Учет результатов реакции осуществляли сразу после добавления реактива Несслера. Результаты биохимических реакций эталонных и эпизоотических штаммов на амиды приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты биохимических реакций микобактерий на амиды

№ п/п	Амиды	<i>M. bovis-8</i>	<i>M. avium</i>
1	ацетамид	–	–
2	мочевина	+	–
3	никотинамид	–	+
4	пиразинамид	–	+
5	сукцинамид	–	–
6	алантоин	–	–

Как видно из таблицы 1, при проведении определения амидазной активности культуры микобактерий стабильно сохранили свои исходные

биохимические свойства. Культуры, относящиеся к бычьему виду: *M. bovis-8*, показали положительные реакции с мочевиной, а птичьих штаммы – *M. avium* – с никотинамидом и пиразинамидом. Порог чувствительности данной реакции был равен 10-25 мкг аммиака на 1 см² поверхности среды.

Результаты изучения культурально-морфологических и биохимических свойств изученных культур показали их стабильность.

После освежения и подтверждения исходных типовых свойств культур микобактерий – *M. bovis-8*, *M. avium*, было проведено тестирование их биологической пробой. Эксперимент выполнен на 6 морских свинок массой 300-350 г. Перед началом опыта было проведено аллергическое исследование внутрикожной туберкулиновой пробой для исключения из опыта животных, сенсибилизированных микобактериями. После получения из вышеуказанных культур микобактерий достаточного количества бактериальной массы путем культивирования их на плотной яичной среде, была изготовлена взвесь микобактерий в стерильном изотоническом растворе NaCl. Концентрация полученной взвеси доведена до 0,02 мг/см³ и морские свинки были заражены исследуемыми культурами в дозе 1 мг/см³ подкожно. 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 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. Результаты проведенной биологической пробы и патолого-анатомического вскрытия на лабораторных животных зараженных вирулентными культурами *M. bovis-8* показали генерализованный туберкулез. Далее были проведены убой и исследования проб биоматериала от морских свинок, сенсибилизированы *M. avium* из которых были получены культуры вышеуказанных видов микобактерий.

Ростовые характеристики тест-штаммов на среде Левенштейна-Йенсена через 2-4 недели при 37°C: *M. bovis-8* – обильный рост, колонии гранулированные, неровные, сухие, рыхлые; *M. avium* обильный рост, колонии гладкие, не пигментированные. По результатам контрольного посева патологического материала, полученных от зараженных вирулентными культурами микобактерий на питательную среду Левенштейна-Йенсена, на 20-36-е сутки также был отмечен рост культур *M. bovis-8*. Таким образом, были проверены биологические свойства культур микобактерий – *M. bovis-8*, *M. avium*. 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 ПЦР, выявляемых в культурах микроорганизмов, а также в различном биологическом материале. Пробы колоний микобактерий, снятые со скошенного агара Левенштейна-Йенсена, ресуспендированы в стерильном физиологическом растворе, подвергнуты убивке, затем перенесены 5 мкл этой пробы в пробирку объемом 1,5 мл и использованы для экстракции ДНК. Выделение ДНК из цельной крови проводилось по инструкции производителя набора. Общий объем реакционной смеси составил – 25 мкл, из которой объем ДНК-пробы – 10 мкл. В пробах 1, 2 наблюдаются специфические полосы размером 390 пар нуклеотидов (рис. 1). Мы получили молекулярно-генетическое подтверждение соответствия изолятов, выделенных от морских свинок, штаммам, которыми ранее проводили заражение данных животных.



Рис. 1. Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации: 1 – проба крови; 2 – пробы колоний *M. bovis*, 3 – отрицательный контроль, 4 – положительный контроль

Далее нами было получено подтверждение методом ПЦР изолята *M. avium*, выделенного от морской свинки после заражения. Изолят, выделенный от морской свинки, соответствует *M. avium* (рис. 2). Таким образом, были освежены культуры микобактерий – *M. bovis*-8, *M. avium*. Результаты

изучения культурально-морфологических и биохимических свойств показали, что у культур наблюдается однородный, достаточный рост колоний.

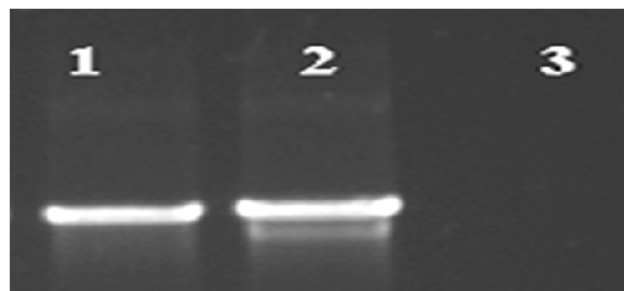


Рис. 2. Электрофорез продуктов ПЦР: 1 – ПКО *avium*, 2 – проба, 3 – ОКО

Наличие роста свидетельствовало о жизнеспособности культур, их стабильности, а также исходные типовые свойства вышеуказанных штаммов подтверждены ПЦР и биопробой. При освежении данные культуры микобактерий сохранили исходные типовые свойства.

Выводы. Был проведен полный биологический контроль культур микобактерий *M. bovis* и *M. avium*. В результате данные культуры сохранили свои исходные типовые свойства и в дальнейшем будут использованы при получении антигена.

Литература:

1. Жумашев А.С., Карабекова С.С. Некоторые вопросы бактериологической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота // Научное обеспечение мероприятий по борьбе с инфекционными и инвазионными болезнями с.-х. животных в Казахстане: сб. научн. трудов, посвящ. 75-летию КазНИВИ. – Алматы, 2000. - С. 123-133.
2. Борисова Т.А. Выявление возбудителя туберкулеза КРС методом ПЦР / Т.А. Борисова// мат. междунар. конф., посвящ. актуальным вопросам микробиологии и инфекционной патологии животных. – Омск, 2004. - С. 231-232.

Рецензент: к.вет.н. Зинина Н.Н.