

## ВЫБОР ИНДИКАТОРНЫХ КУЛЬТУР МИКОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ 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»

**Сансызбай Абылай Рысбайулы,** доктор ветеринарных наук, профессор, генеральный директор 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). 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, пиперазин, алантоин, сукцинамид, а также метод ПЦР и биологическая проба. В результате все вышеперечисленные коллекционные культуры микобактерий после освежения сохранили свои исходные типовые свойства, данные культуры будут использованы в качестве индикаторных тест-культур при изучении 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 МБфаги [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].

**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-8</i>	–	–	–
<i>M. kansasii</i>	+	++	+
<i>M. avium</i>	–	–	–
<i>M. avium</i>	–	–	–
<i>M. avium-780</i>	–	–	–
<i>M. terrae</i>	+	+	+
<i>M. scrofulaceum</i>	+	+	+
<i>M. intracellu- lariae</i>	+	+	+
<i>M. phlei</i>	+	+	+
<i>M. H<sub>37</sub>Rv</i>	–	–	–

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

В связи с этим, тест-культуры микобактерий также имеют большое значение при выделении и изучении МБфагов. В начале опыта много внимания уделялось 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 H<sub>37</sub>Rv*.

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 осужены 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, мочеви́на, 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 бесцвет-

**Таблица 2**

**Результаты биохимических реакций микобактерий на амиды.**

№ п/п	Амиды	<i>M. bovis-8</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium-780</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. phley</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. intracellulareae</i>	<i>M. H<sub>37</sub>RV</i>	<i>M. bovis-БЦЖ</i>
1	Ацетамид	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	Мочевина	+	–	–	–	+	+	+	–	+	+
3	Никотинамид	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–
4	Пиразинамид	–	+	+	+	–	+	+	+	+	–
5	Сукцинамид	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	Алантоин	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

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

ными, отсутствовало выделение пузырьков газа.

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

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

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

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

После освежения и подтверждения исходных типовых свойств коллекционных культур микобактерий было проведено тестирование их биологической пробой.

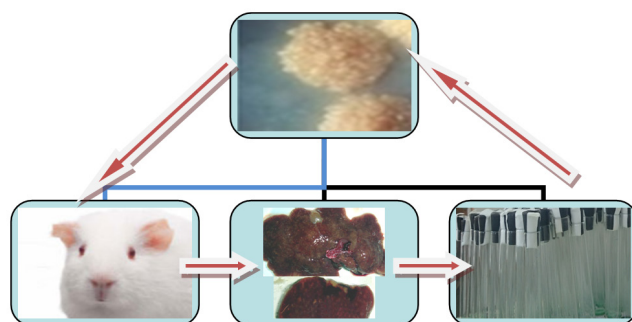
Эксперимент выполнен на 10 морских свинок массой 300-350 г.

Схема постановки биологической пробы представлена на рисунке 1.

Как видно из рис. 1, схема проведения биологической пробы выглядит таким образом:

1 - приготовление взвеси культур микобактерий; 2 – заражение морских свинок исследуемыми культурами; 3 – убой, проведение вскрытия для отбора проб; 4 - проведение бактериологического исследования.

Через 30 дней были взяты пробы крови из сердца морских свинок в объеме 3 – 4 см<sup>3</sup>. После проведения вскрытия от каждого животного были взяты паховые лимфатические узлы, печень, легкие, почки, селезенка для проведения бактериологического исследования. Посевной материал (кроме проб крови) был подвергнут



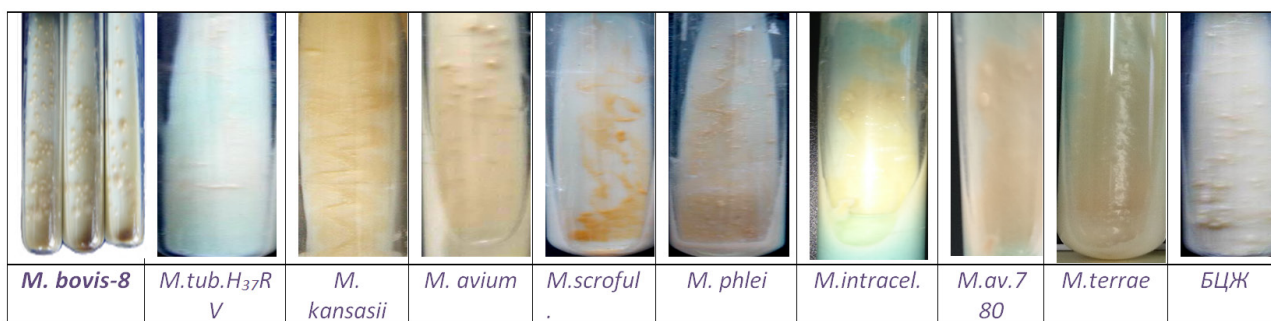
**Рис. 1 - Схема проведения биологической пробы**

предпосевной обработке по общепринятому методу (Аликаевой) и высеян на среду Левенштейна-Йенсена.

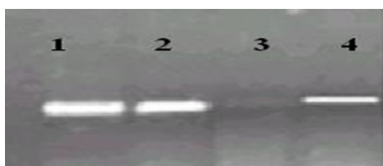
Посевы культивированы в термостате при температуре 37 °С в течение 30-45 суток. Учет результатов проведен путем подсчета колоний, выросших на питательной среде (рисунок 2).

Результаты проведенной биологической пробы и патолого-анатомического вскрытия лабораторных животных, зараженных вирулентными культурами (*M. bovis*-8 и *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv), 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 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 также был отмечен рост культур *M. bovis*-8 и *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (рис. 2).

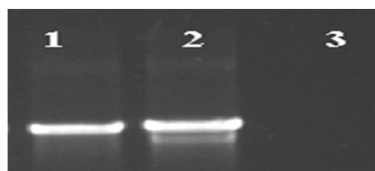
В результате проведения биологической пробы из исследованных проб патологическо-



**Рис. 2 - Выросшие культуры микобактерий на среде Левенштейна-Йенсена**



1 – *M. tuberculosis*, 2 – *M. bovis*, 3 – отрицательный контроль, 4 – положительный контроль



1 – положительный контроль, 2 – *M. avium*, 3 – отрицательный контроль

**Рис. 3 - Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации ДНК микобактерий**

го 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», предназначенных 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* H<sub>37</sub>Rv, *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, кроме того, исходные типовые свойства выше указан-

ных 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, 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. Новые подходы в терапии туберкулеза / Н.С. Сырым, Б.А. Еспембетов, А.Р. Сансызбай // Материалы VIII съезда фтизиатров и пульмонологов Узбекистана. - Ташкент, 2015. –С. 137-138.
4. Сырым, Н.С. Разработка метода получения микобактериофага /Н.С. Сырым, Б.А. Еспембетов // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности», посвященной 80-летию заслуженного ученого, профессора В.Л. Зайцева. 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 *Bacillus megaterium* / Н.А. Романова, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Вестник ветеринарии. – 2013. - № 1 (64). – С. 26-27.

## SELECTION OF MYCOBACTERIUM TEST CROPS TO CHECK LYTIC ACTION OF MYCOBACTERIOPHAGE

Syrym N. S., Espembetov B. A., Sansyzbai A.R.

Kazakhstan Republic, Republic state institution "Science and research institute of biological safety problems" (SRIPBS)  
080409, Zhambylskaya region, Kordaiskiy district, Gvardeiskiy v.

e-mail: [ribs@sra.kz](mailto:ribs@sra.kz)

*Key words:* mycobacterium, tuberculosis, mycobacteriophage, environment objects, biological material.

The article represents results of research, carried out on total biological control of Mycobacterium collection crops in order to confirm initial typical properties, for the purpose of their further usage when studying mycobacteriophages. The test crops were studied for: detection time of initial growth, colony characteristic, chromogenesis, tinctorial properties when applying acid fast stain, biochemical properties (catalase, peroxydase), mycobacterium drug susceptibility, for the purpose of their differentiation, the following items were used: amides - acetamide, urea, nicotinamide, pyrazinamide, allantoin, succinamide, as well as PCR method and biological assay. As a result, all the above mentioned mycobacterium collection crops preserved their initial typical properties after refreshment and the following crops will be used as test crops for mycobacteriophage study.

### Bibliography

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. Syrym, N.S. New approaches of tuberculosis therapy / N.S. Syrym, B.A. Espembetov, A.R. Sansyzbai // Materials of VIII conference of tuberculotherapists and lung specialists of Uzbekistan. - Tashkent, 2015. –pp. 137-138.
4. Syrym, N.S. Elaboration of mycobacteriophage obtaining method / N.S. Syrym, B.A. Espembetov // Materials of international science and practice conference 'Current problems of biology, biotechnology, ecology and bio safety', devoted to 80th anniversary of prominent scientist, professor V.L. Zaitsev. 2015. – pp.272-276.
5. Vasilev, D.A. Biosensor detection of bacteria of Bacillus strain in milk and dairy products for prevention of their spoiling / D.A. Vasilev, S.N. Zolotukhin, N.A. Feoktistova, A.V. Aleshkin // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. - 2013. - №4 (24). - pp. 36-43.
6. Romanova, N.A. Comparative efficiency of methods of Bacillismegaterium phage detection / N.A. Romanova, N.A. Feoktistova, S.N. Zolotukhin, D.A. Vasilev [and oth.] // Veterinary vestnik. – 2013. - № 1 (64). – pp. 26-27.