

УДК619:576.8.078:616-025

* **Лысенко А.П.**, д.вет. наук, профессор,** **Власенко І.Г.**, д.мед. наук, доцент*** **Власенко В.В.**, д.биол. наук, профессор,*** **Бабийчук Ю.В.**, к.мед.н., доцент ©*РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н.Вышелесского НАН Беларуси», г. Минск

**Винницкий торгово-экономический институт КНТЕУ

***Винницкий национальный аграрный университет;

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАЦИЛЛЯРНЫХ И ИЗМЕНЕННЫХ ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ, ВЫРАЩЕННЫХ НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

В настоящее время изучение биохимических свойств трансформированных форм микобактерий представляет большой интерес для более полного раскрытия биологии развития этого микроорганизма. В данной статье приведены результаты исследования отдельных биохимических свойств бациллярных и измененных форм микобактерий. Проведенные биохимические тесты с культурами, полученными из туберкулинов, доказывают наличие живых морфологических форм, относящихся к роду микобактерий.

Ключевые слова: биохимические свойства, трансформированные формы микобактерий, туберкулины.

В настоящее время ни у кого не осталось сомнений по поводу сложной и многообразной биологии развития микобактерий. Благодаря концепции украинских ученых по поводу стадийного развития микобактерий туберкулеза, в основу которой положена изменчивость микобактерий и стадийность их развития - от деления бактериальной клетки различными способами до дальнейшей биологической трансформации их под воздействием различных факторов внешней среды и факторов макроорганизма. Эта концепция нашла свое подтверждение благодаря питательной среде ВКГ и стимулятору роста, позволяющим раскрыть многообразие жизнеспособных форм микобактерий в виде палочек, кокков, овоидов, фильтрующихся, L-форм и других форм которые не способны выявить другие широко известные и применяемые питательные среды (1). К ее достоинствам можно отнести высокую чувствительность, быстрый рост колоний, в том числе в виде ранее неизвестных форм. Полученные культуры дают стойкую суспензию, что позволяет применять реакцию агглютинации (РА) для идентификации изолятов (2).

По нашему мнению, отсутствие заметного прогресса в диагностике и профилактике связано с превалированием представлений об относительно простой биологии и мономорфизме возбудителя туберкулеза. Кроме того, нельзя упускать и тот факт, что автоклавированная культуральная жидкость *M.bovis* 8

даёт на среде ВКГ рост характерных мелких восковидных колоний. (3). Подобный рост давали все исследованные препараты туберкулинов для млекопитающих отечественных и зарубежных производителей.

И все же остается много вопросов в отношении биохимических свойств, антигенного состава и сродства микобактерий выделяемых на среде ВКГ, взаимоотношений между микро- и макроорганизмом и механизма выработки иммунитета у животных и человека, улучшение несовершенных способов диагностики туберкулеза на ранних стадиях.

Целью нашего исследования явилось изучение биохимических свойств форм микобактерий выделяемых на среде ВКГ.

Материалы и методы. В работе использовали 2-3-х недельные культуры микобактерий *M.bovis*BCG, *M.bovis* №8, *M.tuberculosis* H₃₇Rv, *M.avium*1603, *M.fortuitum*342, *M.kansasii*, *M.phlei*, выращенные на среде Гельберга и среде ВКГ. Кроме того, в работе использовали культуры туберкулинов Bioveta, ППД туберкулин Курской биофабрики серии №19, стандартный сухой ППД-туберкулин серии №28 и КАМ, полученные при выращивании их на среде ВКГ.

Реакция восстановления нитратов. Нами было отобрано по 10 мг влажного веса культур со среды Гельберга и среды ВКГ и суспензировано в 1 мл 0,067 М фосфатного буфера (рН = 7,1), содержащего 0,1% нитрата натрия, взвеси инкубировали при 37°C 15-16 часов. Образование нитрата проверяли добавлением в каждую пробу по две капли 2%-ного (W/V) р-диметиламинобензальдегида в 1 мл 10%-ной HCl. О принадлежности культуры к микобактериям человеческого типа (методика Тсукамура) судили по изменению окраски.

Гидролиз твина 80 (0,067M). Для постановки реакции использовали следующие реактивы: 100 мл М/15 фосфатный буфер рН 7; 0,5 мл твина 80; 2 мл основного нейтрального красного 0,1%-ного водного раствора. Все три реагента смешали и разделили полученную смесь по 4 мл в стерильные пробирки, автоклавировали 15 минут при 120°C. После чего, внесли по три платиновые петли каждой культуры в отдельную пробирку, герметизировали их и поместили в термостат. Реакцию учитывали через 4 часа на 5-е и 10-е сутки. Положительным считали тест, если появилась розово - красная окраска до 10-го дня, отрицательным – если окраски нет.

Дегидрогеназная активность (проба Блоха) с глюкозой. Реакцию проводили в агглютинационных пробирках. Для чего отобрали по 1 мл суспензии микробных клеток каждой культуры (10 мг/мл) в фосфатном буфере рН 7,4-7,6 смешали с 1 мл 1%-ной глюкозой и 0,1 мл 0,02%-ного метиленового синего, сверху наслаивали вазелиновое масло. В качестве контроля использовали пробирку с культурой, но без глюкозы.

Проба Блоха с глицерином. По две петли каждой культуры суспензировали в 0,5 мл 0,06 М фосфатного буфера (рН 7,0) с 1%-ным глицерином. К полученной смеси добавили по 0,5 мл метиленовой сини на физиологическом растворе в разведении 1:1000. На поверхность каждой жидкости наслаивали вазелиновое масло.

Большинство кислотоустойчивых сапрофитов обесцвечивает метиленовую синь в первые 30 мин, возбудители туберкулеза - в течение 3-6-12 часов.

Результаты исследования. Согласно проведенным исследованиям (таблица), положительную реакцию восстановления нитратов дали культуры *M.bovis* №8, *M.bovis*BCG, *M.avium*1603, *M.fortuitum* 342, взятые со среды ВКГ, тогда как со среды Гельберга - *M.bovis*BCG, *M.tuberculosis*H₃₇Rv, *M.phlei*.

Дегидрогеназную активность через 30 минут проявили культуры *M.bovis* №8, *M.avium*1603, *M.fortuitum*342, *M.kansasii*, *M.phlei*, выросшие на среде ВКГ и *M.kansasii*, *M.phlei* - на среде Гельберга. Через 3 часа – все исследуемые культуры с ВКГ и *M.fortuitum* 342 с Гельберга. Через 12 часов – все остальные культуры, выросшие на среде Гельберга.

Гидролиз твина через 4 часа дали - *M.phlei* (ВКГ), *M.fortuitum* 342, *M.kansasii* (Гельберга). На 5-е сутки - *M.bovis* №8, *M.kansasii*, *M.phlei* (ВКГ), *M.fortuitum*342, *M.kansasii*, *M.phlei* (Гельберга). Отрицательная реакция - *M.bovis*BCG, *M.avium*1603, *M.fortuitum*342, *M.tuberculosis*H₃₇Rv (ВКГ); *M.bovis* №8, *M.tuberculosis*H₃₇Rv, *M.avium* 1603.

Культуры, полученные из туберкулинов на среде ВКГ, положительно прореагировали в реакции восстановления нитратов, гидролиза твина (на 5-е сутки) и дегидрогеназной активности, кроме КАМа.

На основании полученных результатов мы считаем, что изменение морфологии клетки ведет к изменению биохимических свойств. Так, микобактерии относящиеся к возбудителю туберкулеза бычьего вида, выращенные на среде Гельберга дали, в отличие от возбудителя туберкулеза человеческого вида, строго отрицательный результат в реакции восстановления нитратов, тогда как, молодые микобактерии бычьего вида, выращенные на среде ВКГ, в этой же реакции – положительный результат. Способность восстанавливать нитраты приобрели все исследуемые молодые культуры, полученные при выращивании туберкулинов на среде ВКГ.

Кроме того, проявление дегидрогеназной активности у *M.bovis* №8 через 30 минут после постановки реакции, опираясь на исследования Власенко В.В., позволяет предположить, что на определенном этапе развития микобактерии туберкулеза проходят стадию сапрофитизации, или имеют сходные с сапрофитами структурные элементы и биохимические свойства.

Заключение. Препараты для аллергической диагностики содержат живые морфологические формы, обладающие биохимическими свойствами микобактерий. В результате проведенных исследований было установлено, что биохимические свойства микобактерий могут частично изменяться в определенных стадиях развития. Биохимических свойств бациллярных и измененных форм микобактерий не всегда совпадают. Из этого следует, что использование стандартных биохимических тестов не дает возможности четко идентифицировать вид микобактерий, выращенных на питательных средах. Проведенные биохимические тесты с культурами, полученными из туберкулинов, доказывают наличие живых морфологических форм, относящихся к роду микобактерий. Возникает необходимость постановки биопробы или

генодиагностики (ПЦР) при идентификации микобактерий, выращенных на питательных средах .

Литература

1. Власенко В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности. Винница: Наука. 1998.35 с.

2.Лысенко А.П., Власенко В.В., Агеева Т.Н. и др. Стимулятор роста и среда ВКГ для ускоренного выделения микобактерий, культуральные, патогенные и антигенные свойства изолируемых культур // Ветеринарная медицина

3.Лемиш А.П., Архипов И.Н. Выделение измененных форм микобактерий из крови крупного рогатого скота после введения туберкулина. // Сборник научных трудов молодых ученых национальной академии наук Беларуси. Том 1. – Мн.: ИП Логвинов, 2004.- С 112-114

Summary

Now studying of biochemical properties of the transformed forms mycobacterium represents the big interest for more full disclosing biology of development of this microorganism. In this article results of research of separate biochemical properties mycobacterium and the changed forms mycobacterium are resulted. Use of standard biochemical tests does not give an opportunity precisely to identify a kind mycobacterium, brought up on VKG. The lead biochemical tests with the cultures received from туберкулинов, prove presence of the alive morphological forms concerning to a sort mycobacterium.

Рецензент – д.б.н., проф. Маслянюк Р.П.