

УДК: 619:616.982.2

**Власенко В.В. \*, Власенко И.Г. \*\*, Лысенко А.П. \*\*\*, Войцицкая О.М\*. ©***\* Винницкий национальный аграрный университет**\*\* Винницкий торгово-экономический институт КНТЭУ**\*\*\* Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского  
Национальной академии наук Беларуси*

## **ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕРИЛЬНОСТИ ТУБЕРКУЛИНУ ППД ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

*В статті представлені результати виділення збудника туберкульозу з туберкулінів та вивчення біохімічних властивостей мікобактерій на середовищі Влакон. Показана можливість перевірки туберкуліну на стерильність.*

***Ключові слова:** туберкулін, мікобактерії, біохімічні властивості, поживні середовища.*

**Вступ.** Туберкулез является общим заболеванием для человека и животных. Он был и остается проблемой номер один среди хронических инфекций крупного рогатого скота на всех континентах мира [1,2,3,4]. Напряженность эпизоотической ситуации с туберкулезом среди крупного рогатого скота в мире намного выше, чем эпидемическая. Так, ежегодно, выявляется больных туберкулезом 8-10 млн. человек, а среди крупного рогатого скота – 6 млн. голов [5], соответственно 1,75 больных на 1 млн. населения и 5 тысяч на 1млн. животных в мире. Почти половина населения планеты инфицирована микобактериями туберкулеза. Ежегодно 1 человек, не излеченный от этого заболевания, может инфицировать 15-20 и более людей. Общее количество больных туберкулезом достигает 50-60 млн. В Украине ежегодно выявляется более 30 тыс. больных на впервые диагностированный туберкулез и его рецидивы, из них туберкулез с бактериовыделением составляет около 1/3. Это говорит о недостаточно поставленной микробиологической диагностике туберкулеза. Такие рутинные методы микробиологической диагностики туберкулеза, как трехразовая микроскопия мазка по Циль-Нильсену, посев на среду Левенштейна - Йенсена и Финна - 2 с последующей идентификацией микобактерий и определением чувствительности их к антибактериальным препаратам имеют ряд недостатков. Так, микроскопия мазка по Циль – Нильсену позволяет выявить только кислотоустойчивые микобактерии, не идентифицируя их, а выделение культуры на указанных питательных средах позволяет получить результат для клинициста от 3-4 недель до 2-3 месяцев [ 6]. Такие методики не дают клиницисту возможности получать достоверную информацию относительно лекарственной чувствительности к препаратам, а врач соответственно, не может

© Власенко В.В., Власенко И.Г., Лысенко А.П., Войцицкая О.М., 2012

провести своєчасну раціональну коррекцію режиму антибактеріальної терапії. Слід відзначити і те, що мікобактерії туберкульозу надзвичайно стійкі до дії високих температур, здатні витримувати автоклавну стерилізацію. Так, Straus et Gamaleia, ще в 1891 році повідомляли, що при введенні в вени кролика убитих тривалим нагріванням при 130°C туберкульозних бацил, виникають ураження, ідентичні тим, які викликають живі культури, в тому числі і казеозне переродження; при введенні в брюшну порожнину кролика, морської свинки, собаки автоклавованих бацил розвивається типовий туберкульозний перитоніт [7]. Трохи пізніше, Grancher і Ledoux – Lebard (8) в 1901 році, повідомляли, що висушені культури збудителя туберкульозу, які піддавалися дії сухого жару, виявилися більш стійкими, вони зберігали свої властивості після нагрівання в терміні 2 і 3 години при 100°C. Можливо цим пояснюється той факт, що досліджувані препарати туберкуліну ППД для млекопитаючих вітчизняних і зарубіжних виробників давали ріст характерний для збудителя туберкульозу [9]. Враховуючи вищевикладене, українськими і білоруськими вченими була розроблена і введена мікробіологічна методика прискореного виявлення мікобактерій туберкульозу на початкових стадіях розвитку захворювання з використанням поживної середовища ВКГ і антісывороток до *M. bovis* [10,11].

Метою нашого дослідження було виявлення збудителя туберкульозу з туберкуліну і вивчення біохімічних властивостей мікобактерій, виділених на середовищі Влакон.

#### **Матеріали і методи.**

В роботі використовували 2-3 тижневі культури мікобактерій *M. bovis*, *M. tuberculosis* H<sub>37</sub> Rv, *M. avium* 1603, *M. fortuitum* 342, *M. kansasii*, вирощені на середовищі Гольберга і середовищі Влакон. Отримані культури з туберкуліну ППД пересівали на середовище Гольберга без малахітового зеленого двічі, після чого робили посів на середовище Гольберга з малахітовим зеленим і отриману культуру використовували для біохімічних досліджень. Для вивчення біохімічних властивостей мікобактерій використовували наступні тести:

- реакція відновлення нітратів;
- гідроліз твіна 80;
- дегідрогеназна активність з глюкозою;
- дегідрогеназна активність з гліцерином.

В якості контролю використовували середовище Гольберга. Методика біохімічних реакцій наступна.

*Реакція відновлення нітратів.* Нами було обрано по 10 мг вологої ваги культур з середовища Гольберга і середовища Влакон і суспензовано в 1 мл 0,067 М фосфатного буфера (рН = 7,1), що містить 0,1% нітрату натрію, ваги інкубували при 37°C 15-16 годин. Утворення нітрату перевіряли додаванням в кожен пробір по дві краплі 2%-ного (W/V) р - диметиламінобензальдегіду в 1 мл 10%-ної НС. О приналежності культури до

микобактериям человеческого типа (методика Тсукамура) судили по изменению окраски.

*Гидролиз твина 80 (0,067M).* Для постановки реакция использовали следующие реактивы: 100 мл. M/15 фосфатный буфер pH 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- 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 pH 7,4-7,6 смешали с 1 мл 1%-ной глюкозой и 0,1 мл 0,02%-ного метиленового синего, сверху наслоили 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 (pH 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 наслоили вазелиновое масло.

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

#### **Результаты исследования.**

В результате исследования установлено, что среда Влакон обладает повышенной биологической активностью по сравнению с контрольной средой. Так, в тесте редукция нитратов, культуры *M. bovis* на контрольной среде реакции не проявляли, тогда как на среде Влакон эти культуры давали положительную реакцию в 90% случаях. Эти же культуры в тесте гидролиз твина 80 из контрольной и опытной среды имели одинаковую активность (50%). Рассматривая культуру *M. bovis*, полученную на опытной среде, следует отметить, что дегидрогеназная активность с 1%- глюкозой через три часа составляла 30%, тогда как на контрольной она не проявилась. Через 12 часов в этой же реакции, активность культуры с обеих сред не имела отличия и составила 100% (табл.1,2.).

Таблиця 1

**Биохимические свойства микобактерий, полученных на среде Гольберга**

№ п/п	Название биохимической реакции	Среда Гольберга (контроль)						
		M. bovis	M. tuberculosis H <sub>37</sub> Rv	M. avium 1603	M. fortuitum	M. kansasii	ППД Туберкулин с.19	Сухой ППД с.28
1.	Редукция нитратов	10/0	10/90	6/0	10/90	5/100	5/40	5/60
2.	Гидролиз - 5-е сутки	10/50	10/0	6/0	10/30	5/100	5/60	5/60
	- 10-е сутки	10/50	10/0	6/0	10/30	5/100	5/60	5/80
3.	Дегидрогеназная активность с 1% глюкозой - 3 часа	12/0	12/0	6/0	10/70	5/100	6/33,3	6/50
	- 12 часов	12/100	12/91,7*	6/100	10/100	5/100	6/100	6/100
4.	Дегидрогеназная активность с глицерином - 3 часа	8/0	8/0	6/0	10/80	5/100	6/50	6/100
	- 24 часа	8/100	8/87,5	6/100	10/100	5/100	6/100	6/100

Таблиця 2.

**Биохимические свойства микобактерий, полученных на среде Влакон**

№ п/п	Название биохимической реакции	Среда Влакон (опыт)						
		M. bovis	M. tuberculosis H <sub>37</sub> Rv	M. avium 1603	M. fortuitum	M. kansasii	ППД Туберкулин с.19	Сухой ППД с.28
1.	Редукция нитратов	10/90	10/90	6/83,3	10/100	5/100	5/80	5/80
2.	Гидролиз - 5-е сутки	10/50	10/0	6/0	10/30	5/100	5/60	5/60
	- 10-е сутки	10/50	10/0	6/0	10/30	5/100	5/60	5/60
3.	Дегидрогеназная активность с 1% глюкозой - 3 часа	12/30	12/0	6/100	10/70	5/100	6/50	6/66,7
	- 12 часов	12/100	12/100*	6/100	10/100	5/100	6/100	6/100
4.	Дегидрогеназная активность с глицерином - 3 часа	8/100	8/50	6/83,3	10/80	5/100	6/100	6/100
	- 24 часа	8/100	8/100	6/100	10/100	5/100	6/100	6/100

Примечание:

В числителе - количество проб, а в знаменателе количество положительных проб в процентах

\* Комплекс M. bovis включает M. bovis и BCG

Эта же закономерность, но более выраженная, проявилась в реакции дегидрогеназной активности с глицерином, то есть в культурах с Влакон через три часа наблюдалась положительная реакция в 100% случаях, в то время как с культурами, полученными с контрольной среды, реакции не наблюдалось. Через 24 часа результаты тестов были идентичны на контрольной и опытной среде – 100%.

При исследовании культур *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>, полученных с контрольной и опытной среды в реакции редуции нитратов, гидролиз твина 80, дегидрогеназная активность с 1% глюкозой достоверных различий не наблюдалось, то есть результаты совпали в 100% случаях. Исключением явилась реакция дегидрогеназной активности с глицерином, где культуры со среды Влакон проявили активность в 50% случаев, а в культурах с контрольной среды активности не наблюдалось. Учет этой реакции через 24 часа показал, что культуры с опытной среды проявляют активность в 100% случаев, в то время как с контрольной среды – 87,5%, то есть на 12,5% ниже.

При изучении редуции нитратов *M. avium* 1603, полученных на среде Влакон, в 83,3% случаев были положительные результаты, тогда как с контрольной средой редуция нитратов не наблюдалась. То есть клетки микобактерий, полученные со среды Влакон, имели большую ферментативную активность. Биохимический тест гидролиз твина 80, различий между культурами, полученными с контрольной и опытной среды, не выявил. Анализируя дегидрогеназную активность с 1% глюкозой, следует заметить, что культуры полученные со среды Влакон через 3 часа имели положительную реакцию в 100% случаях, тогда как на контрольной среде этот результат был получен только через 24 часа. Аналогичная закономерность наблюдалась в реакции дегидрогеназной активности с глицерином. То есть культуры с опытной среды (Влакон) через 3 часа имели выраженную активность в 83,3% случаев а через 24 часа - в 100%, тогда как на контрольной среде активность проявилась только через 24 часа.

Анализируя тест редуции нитратов микобактериями *M. fortuitum* следует отметить, что культуры со среды Влакон всего в 10% случаев давали больше положительных результатов, чем с контрольной среды. Результаты исследований культуры *M. fortuitum* по тестам гидролиз твина 80, дегидрогеназная активность с 1% глюкозой и с глицерином разницы в биохимической активности между культурами с контрольной и опытной сред не выявили.

Следует заметить, что *M. kansasii* полученные с опытных и контрольных сред за испытываемыми биохимическими тестами показали 100% совпадение результатов.

Культуры полученные с туберкулинов (ППД для млекопитающих), обладали от 30 до 60% выше ферментативной активностью как с контрольной так и с опытной сред по сравнению с *M. bovis* полученной с опытной среды.

На основании полученных результатов мы считаем, что питательная среда Влакон обладает способностью повышать ферментативную активность

микобактериальних кліток. По видимому, эта способность дает возможность на среде Влакон получать рост микобактериальних кліток, тогда когда на общепринятых средах он отсутствует. Повышенная активность работы ферментов и натрий ↔ калиевых насосов на питательной среде Влакон обусловлена стимулятором роста, который входит в состав среды. По-видимому, можно согласиться, что на определенном этапе развития микобактерии туберкулеза имеют сходные с сапрофитами биохимические свойства о чем свидетельствуют такие тесты, как гидролиз твина 80, дегидрогеназная активность с 1% глюкозой и глицерином. Следует иметь в виду и то, что препараты для аллергической диагностики содержат живые морфологические формы, обладающие биохимическими свойствами микобактерий.

#### **Выводы:**

1. Питательная среда Влакон обладает способностью стимулировать биохимические процессы в клетках микобактерий, что дает возможность получить рост микобактерий с пониженной ферментативной активностью (жизнедеятельностью).

2. Проведенные биохимические тесты с культурами, полученными из туберкулинов, доказывают наличие живых морфологических форм, относящихся к роду микобактерий

3. Учитывая высокую чувствительность среды Влакон, она может быть рекомендована как питательная среда для контроля качества туберкулинов, используемых в гуманитарной и ветеринарной медицине.

#### **Литература**

1. Овдиенко Н.П. Эпизоотология крупного рогатого скота за рубежом // Ветеринария.–1989.–№ 8.–С.7–10.

2. Ткаченко О.А. Туберкулез і мікобактеріозна інфекція великої рогатої худоби // Автор. дис.... докт. вет. наук.–Київ–1999.–35 с.

3. Туберкулез животных и меры борьбы с ним / Ю.Я. Кассич, А.Т.Борзяк, А.Ф. Кочмарский, О.В. Мартма и др.: Под ред. Ю.Я. Кассича.- К.: Урожай, 1990.–304с.

4. Юсковец М.К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц.– Минск, 1963.–450 С.

5. Кузин А.И. Туберкулез сельскохозяйственных животных и его профилактика. –М.: Росагропромиздат, 1992.–189 с.

6. Фещенко Ю.І., Мельник В.М., Турченко Л.В., Власенко В.В. Клінічна Оцінка Швидкого Виявлення Мікобактерій На Живильному Середовищі ВкГ Український пуль монологічний журнал 2003 №2 с. 15-18.

7. Straus et Gamaleia. *Contribution a Vetude da poison taberculeux*. Archives de medecini experim., 1891, p. 705.—Auclair. *Etude, expcrimentale sur les poisons du bacilli tuberculeux*. Paris, 1897.

8. Grancher и Ledoux – Lebard цитируется по Эд Нокарду, Э Легланчу Микробные болезни животных. Санкт – Петербург 1908 г. с. 124.

9. Лемиш А.П., Красникова Е.Л., Полоз А.И. Биохимические свойства культур микобактерий выращенных на питательной среде ВКГ.

10. Лысенко А.П., Красникова Е.Л., Полоз А.И., Агеева Т.Н. Морфология и культуральные свойства микобактерий, выращенных на среде ВКГ // Ветеринарная наука производству - Науч. труды, - Минск 2002. -Выпуск 36 - с. 69-75.

11. Власенко В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности. Винница: Наука, 1998.- 350с.

#### **Summary**

**Vlasenko V.V., Vlasenko I.G., Lysenko AP., Voytsitskaya O.M.**

#### **RAPID METHOD FOR DETERMINING STERILITY TUBERCULIN PPD FOR MAMMALS.**

*The paper presents the results of a selection agent of tuberculosis with tuberculin and the study of biochemical properties of mycobacteria in the environment Vlakon. The possibility of tuberculin test for sterility.*

**Key words:** *tuberculin, Mycobacterium, biochemical properties, nutrient medium.*

Рецензент – к.б.н., доцент Турко І.Б.