

УДК 619: 616.995.636

**Сырым Н.С.<sup>1</sup>**, кандидат ветеринарных наук

**Еспембетов Б.А.<sup>1</sup>**, кандидат ветеринарных наук

**Сиябеков С.Т.<sup>2</sup>**, кандидат ветеринарных наук, профессор

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, г. Алматы, Республика Казахстан

<sup>2</sup>НАО «Казахский Национальный аграрный университет», г. Алматы, Республика Казахстан

## **ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ СХЕМ ПЕРВИЧНОЙ ОБРАБОТКИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИОФАГОВ**

### **Аннотация**

Пробоподготовка является основным этапом научных исследований. Выбор метода на данной стадии зависит главным образом от поставленной цели и метода последующего определения. Правильный выбор метода пробоподготовки обеспечивает получение надежных результатов всего исследования.

Проведенные исследования по подбору метода выделения микобактериофагов показали, что при использовании первой схемы микобактериофаги не выделены. Это объясняется тем, что в противоположность другим фагам, микобактериофаг в природе, особенно в почве больше распространен. Однако попытки непосредственного его выделения не приводят к положительным результатам. Фаги в объектах внешней среды находятся в малом количестве, поэтому фильтрат при посевах не вызывает бактериолиза, вследствие этого необходимо обогащать пробы микобактериями, инкубировать и продолжать эту процедуру несколько недель.

В статье приведены оптимальные схемы по подбору первичной обработки проб из объектов внешней среды и биологического материала для выделения и создающей условия для оптимальной активности противотуберкулезного фага. Отобран эффективный метод получения МБ-фагов из объектов внешней среды. Получены 4 вида микобактериофагов, лизирующие атипичные микобактерии из объектов внешней среды.

**Ключевые слова:** микобактерии, микобактериофаг, туберкулез, пробоподготовка, биологический материал, объекты из внешней среды.

**Введение.** Пробоподготовками к исследованиям различных образцов для выделения бактериофагов являются: гомогенизация (достижение однородности пробы), обогащение пробы (ее концентрирование), удаление мешающих примесей (повышение селективности) и др. Помехи от неизвестных факторов должны быть полностью исключены. Гомогенизация пробы особенно важна для твердых (сыпучих) образцов проб и реже жидких. Она обеспечивает представительность исследований (воспроизводимость повторяемых результатов) и во многом технически облегчает проводимые исследования.

Согласно нашим наблюдениям успешная изоляция фага зависит от целого ряда факторов: соответствующего состава питательной среды, обогащению исследуемого материала суспензией культур микобактерий, интенсивного роста микобактерий и соответствующего количества образца.

В литературе [1] описывается способ пробоподготовки: пробы снятых с объектов внешней среды, на выделение микобактерий, заключающийся в воздействии на них раствором едкого натра, измельченные пробы заливают физиологическим раствором на 24 ч при комнатной температуре, фильтруют через вату, центрифугируют 20 мин при 3-4 тыс. оборотах в минуту, к осадку добавляют 1,5%-ный раствор лаурилсульфата на 1,5%-ном растворе едкого натра, выдерживают 20 мин, центрифугируют 20 мин при 3-4 тыс. оборотах в минуту, осадок 2-3 раза отмывают физиологическим раствором и делают посев на питательную среду.

Также разработан способ предпосевной обработки для выделения L-форм микобактерий из патологоанатомического материала и объектов внешней среды заключающийся в обработке патологоанатомического материала 2-3%-ным раствором серной кислоты и дополнительной

фильтрации, которая позволяет повысить на 30% высеваемость микобактерий туберкулеза из биоматериала от животных и из объектов внешней среды [2, 3].

Способ предпосевной обработки [4] патологического материала для выделения микобактерий, включающий воздействие дезинфекционным средством, где в качестве дезинфекционного средства используют «Септустин», причем обработку проводят смешиванием водного раствора «Септустина» в концентрации 0,5% и патологического материала в объемном соотношении 1:2 в течение 30 минут при комнатной температуре с последующей двукратной в течение 15 минут отмывкой физиологическим раствором.

Все выше перечисленные способы изобретения предназначены для предпосевной обработки для выделения микобактерий или их L-форм.

Результаты работы проведенного нами обзора доступных Интернет-ресурсов и патентного поиска глубиной 20 лет в данной области по первичной обработке схем тестовых образцов для выделения противотуберкулезного фага не было обнаружено.

Целью исследования является подбор оптимальных схем первичной обработки для выделения микобактериофагов из различных образцов для создания оптимальных условий при выделении противотуберкулезного фага.

**Материалы и методы исследования.** Для выполнения исследований были использованы: пробы, взятые из объектов внешней среды и биологический материал. В качестве индикаторных тест-культур были использованы штаммы микобактерий – *M. bovis-8*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. avium-780*, *M. tuberculosis H37Rv*, *M. phlei*, *M. terrae*, *M. intracellulare* выделенные в разные годы из патологического материала и объектов внешней среды.

**Результаты и обсуждение.** В начале опыта нами были выбраны и освежены индикаторные тест-культуры микобактерий для обогащения и проверки специфичности литического действия при выделении микобактериофагов и поставлены эксперименты по подбору для первичной обработки оптимальных схем для выделения микобактериофага. По выделению микобактериофагов были применены 2 метода.

Далее поставлены эксперименты по подбору для первичной обработки схем тестовых образцов для выделения фагов. При этом основывались на создании условий, обеспечивающих лизирование фагом микобактерий туберкулеза.

Образцы, из объектов внешней среды привезенные из различных областей республики - навески (100 г) почвы и навоза после тщательного растирания в стерильных фарфоровых ступках переносили в колбы, содержащие 150 см<sup>3</sup> жидкой питательной среды Dubos Broth Base, а также пробы из сточных вод (120 см<sup>3</sup>) вносили в колбы, содержащие 30 см<sup>3</sup> (5-и кратно концентрированной) этой же среды наиболее благоприятную для развития тех микобактерий, против которых искали фаг. Пробоподготовка из объектов внешней среды представлена на рисунке 1 (а). Смесь тщательно взбалтывали и давали отстояться в течение часа, после чего отбирали по 10-15 см<sup>3</sup> надосадочной жидкости для предварительного исследования ее на наличие фагов (1 схема).

Оставшийся в колбах материал помещали в термостат для инкубирования в течение 1,5 – 2 месяцев при 37°. Инкубируемый материал обогащали еженедельно 5 см<sup>3</sup> густой взвесью культур микобактерий *M. intracellulare*, *M. phlei*, *M. terrae*, *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* и 15-30-дневные культуры *M. bovis-8*, *M. kansasii*, *M. avium*, выращенные на питательной среде *Dubos Agar Base*. Взвесь микобактерий готовили на 5-и кратно концентрированных средах *Dubos Broth Base*, с целью увеличения источника питания для микобактерий (2 схема).

Колбы ежедневно взбалтывали с целью улучшения аэрации инкубируемой смеси. По окончании срока инкубации очищали от механических примесей путем бумажного фильтрования, рисунок 1(б), надосадочную жидкость сливали в центрифужные пробирки, рисунок 1(в)

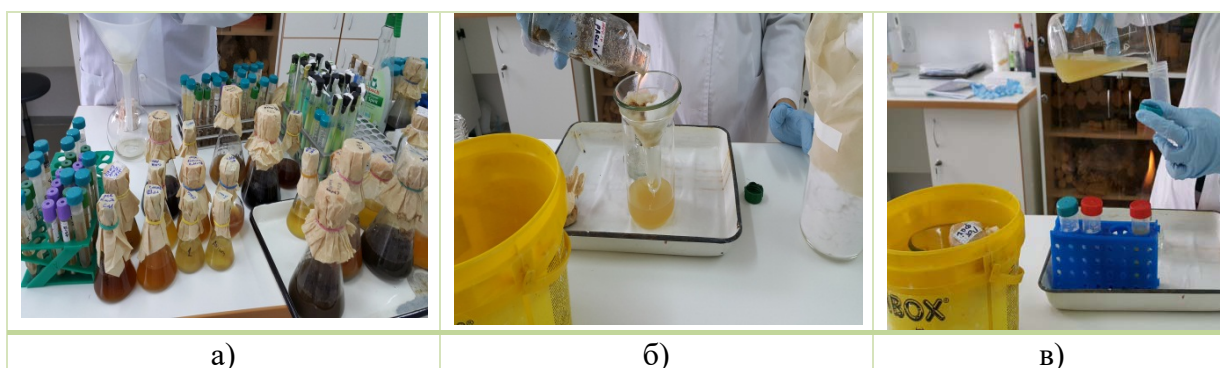


Рисунок 1 - Пробоподготовка из объектов внешней среды

Затем центрифугировали при 2500 об/мин, в течение 20 мин, рисунок 2 (г), фильтровали через стерилизующие фильтры Sterilfiltrations system CN - 115 ml 0,2μ; 150 ml 0,45μm; 150 ml 0,8μ, рисунок 2 (д). Полученный таким образом фильтрат исследовали на наличие в нем бактериофагов, рисунок 2 (е).

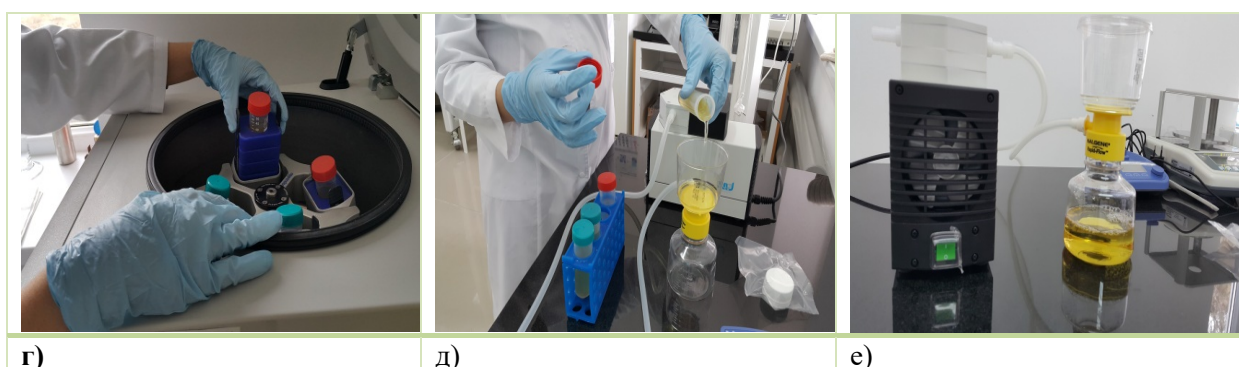


Рисунок 2- Пробоподготовка из объектов внешней среды

В результате наличие фага в том или ином субстрате судили по лизису чувствительной к нему микробной тест-культуры. Специфичность выделенных фагов в отношении различных видов микобактерий была изучена по их литической способности путем нанесения одной капли фаголизата на свежеприготовленные газоны исследуемых культур, результаты, которых приведенных ниже на рисунке 3.

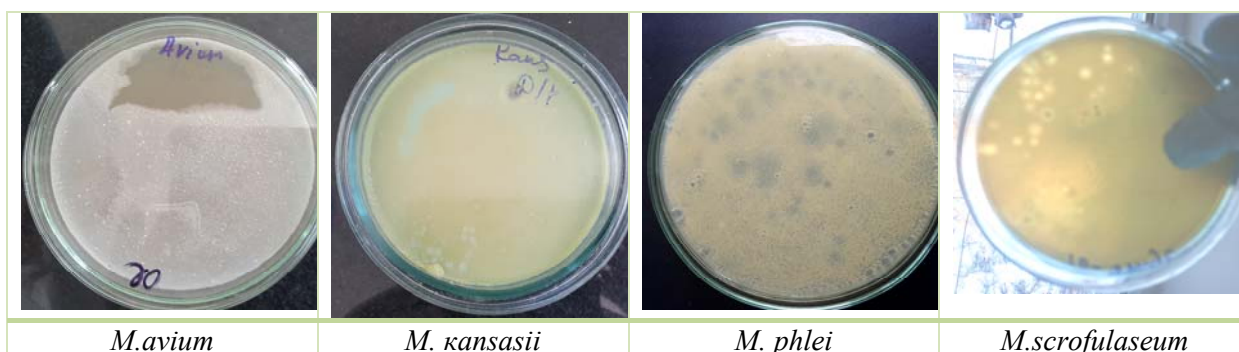


Рисунок 3 - Выделенные фаги в отношении к *M.avium*, *M. kansasii*, *M. phlei*, *M.scrofulaseum*

Все выделенные 4 микобактериофагов имели титр в пределах 10<sup>7</sup> - 10<sup>9</sup> по Апфельману и 10<sup>9</sup> - 10<sup>10</sup> по Грациа, обладали выраженной специфичностью в отношении к *M. phlei*, *M.scrofulaceum* и не проявляли активности в отношении других видов микобактерий туберкулеза.

Все указанные фаги сохраняли литическую активность в течение 2 месяцев, были устойчивы к нагреванию в пределах 50°C - 70°C в течение 30 минут. Микобактериофаги были устойчивы к действию 10% раствора хлороформа в течение 45 минут.

На рисунке 4 визуально видно, что разработанная нами вторая усовершенствованная методика по выделению и титрованию микобактериофагов оказалась успешной и показала положительные результаты по получению микобактериофагов.

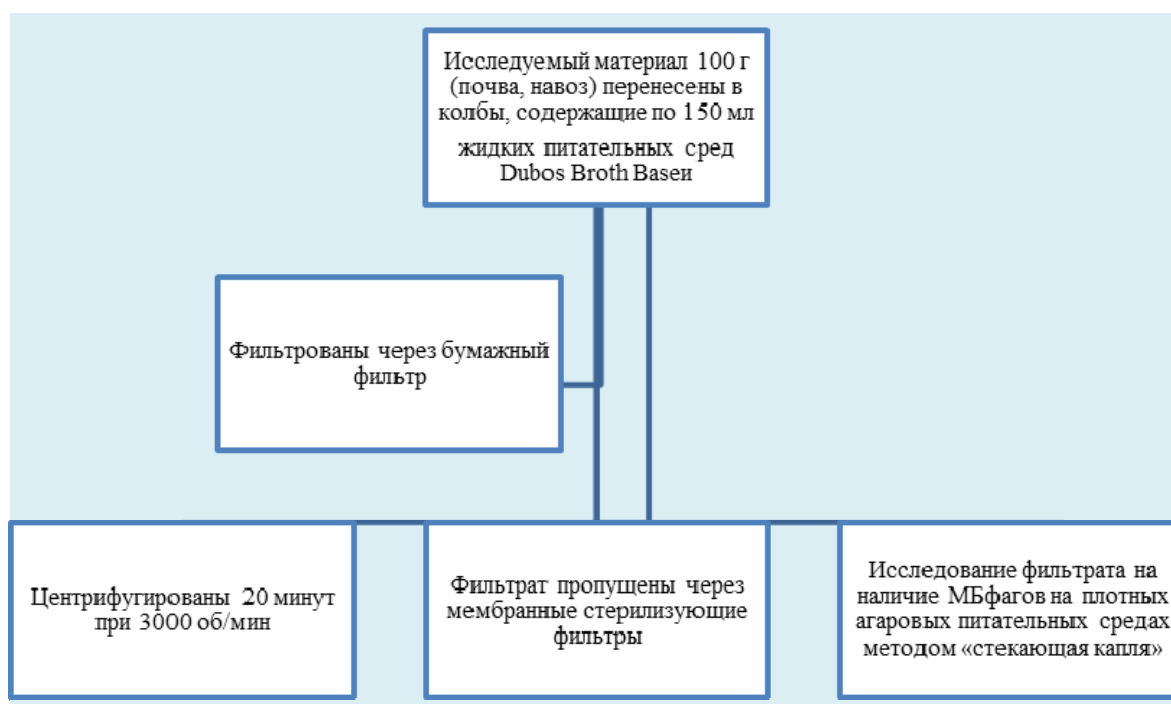


Рисунок 4 - Схема первичной обработки тестовых образцов

Таким образом, разработанный нами метод позволил впервые выделить – 4 микобактериофага лизирующих атипичные микобактерии из объектов внешней среды доставленных из различных областей РК.

**Заключение.** Проведенные исследования по подбору метода выделения микобактериофагов показали, что при использовании первой схемы микобактериофаги не выделены. Это объясняется тем, что в противоположность другим фагам, микобактериофаг в природе, особенно в почве больше распространен. Однако попытки непосредственного его выделения не приводят к положительным результатам. Фаги в объектах внешней среды находятся в малом количестве, поэтому фильтрат при посевах не вызывает бактериолиза, вследствие этого необходимо обогащать пробы микобактериями, инкубировать и продолжать эту процедуру несколько недель.

Таким образом, отобран эффективный метод получения МБ-фагов из объектов внешней среды. Получены 4 вида микобактериофагов, лизирующие атипичные микобактерии из объектов внешней среды доставленных из различных областей РК.

Разработанная нами вторая усовершенствованная методика для выделения и титрования фагов показала наилучшие результаты. В связи с этим в дальнейших опытах были применены отработанная нами ниже указанная 2 схема (рисунок 2) для выделения противотуберкулезных фагов.



### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пат. № 2402781 Российская Федерация, МПК G01N 33/84. Способ предпосевной обработки проб, снятых с объектов внешней среды, на выделение микобактерий / Р.А. Нуралинов, А.А. Гаргацов, Э.А. Вердиева, М.И.; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение «Прикаспийский зональный НИВИ» Россельхозакадемии. - №RU 2 402 781 C1; заявл. 23.06.09; опубл 10.12.11. - [https://yandex.ru/patents/doc/RU2402781C1\\_20101027](https://yandex.ru/patents/doc/RU2402781C1_20101027).

2. Секин Е.Ю. L-трансформация микобактерий, свойства и способы культивирования L-форм: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03.- Омск, 2006.- 132 с. - <http://www.dslib.net/vet-virusologia/l-transformacija-mikobakterij-svoystva-i-sposoby-kultivirovanija-l-form.html>.

3. Пат. № 39178 Российская Федерация, МПК А 01 С 7/20. Способ выделения L-форм микобактерий из патологического материала / Е.В. Тарасова, А.Ф. Дорофеев, А.М. Коваленко; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородская государственная сельскохозяйственная академия имени В.Я. Горина». - № 0002473906; опубл 27.01.13.- <https://edrid.ru/en/rid/216.012.20d5.html>.

4. Пат. № RU2542460C1 Российская Федерация. Способ предпосевной обработки патологоанатомического материала для выделения L-форм микобактерий / Е.А. Лискова, К.Н. Слина, М.В. Берус, Н.В. Гришина; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение Научно-исследовательский ветеринарный институт Нечерноземной зоны Российской Федерации Российской академии сельскохозяйственных наук. - № RU2542460C1; заявл. 15.10.13; опубл 20.02.15. - <https://patents.google.com/patent/RU2542460C1/ru>.

### ТҮЙІН

Сынама дайындау ғылыми зерттеулердің негізгі кезеңі болып табылады. Осы сатыда әдісті таңдау негізінен қойылған мақсат пен алдағы анықтау әдісіне байланысты. Сынама дайындау әдісін дұрыс таңдау барлық зерттеудің сенімді нәтижелерін алуды қамтамасыз етеді.

Микобактериофагтарды бөлу әдісін таңдау бойынша жүргізілген зерттеулер микобактериофагтың бірінші схемасын пайдалану кезінде бөлінбегенін көрсетті. Бұл басқа фагтарға қарама-қарсы, табиғатта микобактериофаг, әсіресе топырақта көп таралған. Алайда, оны тікелей бөлу әрекеті оң нәтижелерге әкелмейді.

Сыртқы орта объектілеріндегі фагтар аз мөлшерде болады, сондықтан себу кезінде филтрат бактериолизис тудырмайды, осының салдарынан сынамаларды микобактериялармен қамтамасыз етумен, инкубациялау және осы әрекетті бірнеше апта бойы жалғастыру қажет. Мақалада туберкулезге қарсы фагтың оңтайлы белсенділігі үшін жағдай жасайтын және бөліп алу үшін сыртқы орта объектілерінен және биологиялық материалдан сынамаларды бастапқы өңдеуді таңдау бойынша оңтайлы схемалар келтірілген. Сыртқы орта объектілерінен МБ-фагтарды алудың тиімді әдісі іріктелді.

Сыртқы орта объектілерінен МБ-фагтарды алудың тиімді әдісі іріктеліп, атиптік микобактерияларға қарсы микобактериофагтардың 4 түрі алынды. Фагтарды бөлу және титрлеу үшін біз жасаған екінші жетілдірілген әдістеме ең жақсы нәтиже көрсетті. Осыған байланысты алдағы тәжірибелерде туберкулезге қарсы фагтар бөлу үшін 2 схема қолданылады.

### RESUME

Sample preparation is the main stage of scientific research. The choice of method at this stage depends mainly on the goal and the method of subsequent determination. The correct choice of sample preparation method ensures reliable results of the entire study.

The conducted researches on selection of a method of allocation of mycobacteriophages have shown that at use of the first scheme mycobacteriophages are not allocated. This is because, in contrast to other phages, mycobacteriophage in nature, especially in the soil is more common. However, attempts to isolate it directly do not lead to positive results. Phages in the objects of the environment are in small quantities, so the filtrate in crops does not cause bacteriolysis, therefore it is necessary to enrich the samples with mycobacteria, incubate and continue this procedure for several weeks.

The article presents the optimal schemes for the selection of primary processing of samples from the objects of the environment and biological material for the isolation and creating conditions for optimal activity of the antitubercular phage. An effective method for obtaining MB-phages from environmental objects was selected. 4 types of mycobacteriophages lysing atypical mycobacteria from environmental objects were obtained.

ӘОЖ 636.7:619.99 (574.2) (045)

**Үсенбаев А.Е.**, ветеринария ғылымдарының кандидаты, доцент

**Жанабаев А.А.**, ветеринария ғылымдарының кандидаты

**Бисенгалиев Р.М.**, ауылшаруашылық ғылымдарының кандидаты

**Нышанбек А.Қ.**, магистрант

«С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті» КеАК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы

### **ЦЕЛИНОГРАД АУДАНЫНДАҒЫ (АҚМОЛА ОБЛЫСЫ) КҮЙІСТІ АУЫЛШАРУАШЫЛЫҚ МАЛДАРЫ МЕН ИТТЕР АРАСЫНДАҒЫ САРКОЦИСТОЗДЫҢ ТАРАЛУЫ**

#### **Аннотация**

Жануарлар саркоцистозы созылмалы инвазиялық аурулар қатарына жатады. Целиноград ауданында ауыл шаруашылық күйіс малдары мен иттер арасындағы аурудың эпидемиялық рөлі анықталды. Осы мақсатта ірі қара мен ұсақ малдың 314 ұшаларынан алынған 1164 сынамалары микроскопиялық әдіс пен 45 иттің нәжістері флотациялау арқылы зерттелінді. Алты айдан асқан жануарлардың инвазия экстенсивтігі ірі қара малда 4,1% және ұсақ малда 11,3% құрады. Саркоцистозбен залалдану көрсеткіші орташа жылдық деңгейден жоғары күзде және қыста (қараша-қаңтар), ал көктемде және жазда төмен (наурыз-тамыз) болады. Ұсақ малдың барлық саркоцисталарымен зақымданған ұшаларының жыл мезгілдерінде ең көп саны қыста (17,8%) және күзде (10,7%), ал ең азы - көктемде (6,0%) және жазда (1,0%) тіркелді. Ірі қара мал мен қой ұшаларының әр түрлі мүшелерінен саркоцистозға залалдануы орташа инвазия экстенсивтігі 7,4% құрады. Паразитпен залалдану көрсеткіштерінің ең жоғары деңгейі өңеш бұлшық етінде байқалды Целиноград ауданында саркоцистозмен (ооцисталар) залалданған иттердің орта саны 4,4% болды. Жалпы алғанда, аймақтағы күйіс малдары мен иттердің саркоцистозмен жұқтыру көрсеткіші төмен деңгейді құрайтыны анықталды.

**Түйін сөздер:** саркоцистоз, күйісті малдар, иттер, инвазияның экстенсивтігі, интенсивтігі, органдарда үлестірілуі.

**Кіріспе.** Кең таралған созылмалы инвазиялық ауруларды алдын алу, оларға қарсы іс-шараларды зерттеу және дайындау мал басын сақтау мен өнімділігін арттырудың бір жолы болып саналады. Осындай инвазияға жануарлар саркоцистозы жатады. Ол бір торшалы қарапайымдылар қоздыратын және жануарлар мен адам бұлшықетінің зақымдалуымен сипатталатын антропоознозды ауруға жатады [1].

Саркоцистоздар *Sarcocystis* туысына жататын қарапайымдылардың түрлері тудыратын антропоознозды аурулар болып табылады. Олар жер беті омыртқалары - сүтқоректілер, құстар және бауырымен жорғалаушылар арасында кең таралған. Қазіргі уақытта саркоцисталар 200-ге жуық жануар түрлерінің бұлшықетінде табылды. Ол әсіресе үй жануарларында көбірек кездеседі. Қой мен ірі малдың залалдануы 100%-ға жетуі мүмкін. Инвазияның жоғары қарқындылығы кезінде жануарлардың қондылығы күрт төмендейді, зақымданған мүшелердің (жүрек, өңеш, диафрагма, қаңқа бұлшықеттері және т. б.) қызметі бұзылады. Саркоцисталар өзінің өмір сүру барысында саркоцистин токсинін бөледі, жануар ағзасына жағымсыз әсер етеді, ауру жануарлардың етінің сапасы төмендейді [2].