

In order to increase the fertility of the uterine livestock, three schemes of hunting stimulation using stimulating hormones (progesterone, estradiol, FSH, LH, CIDR, etc.) were developed and tested, and the effectiveness of the scheme where the hormonal drug CIDR was used was determined. Moreover, the number of cows that came to the hunt was 8.3 and 23.3% more than when using other stimulation schemes. When applying the proposed method of stimulation, the number of cows that came to the hunt from the treated amount was 92-95.4%, in the tested basic farms. In addition, methods have been developed for treating cows for hypofunction and ovarian cysts using hormonal preparations (Fertagil, Surfagon, etc.). When comparing two hormonal stimulation regimens using CIDR hormone, cow fertility increased by 5.9%.

УДК 615;616.982.21

Сырым Н.С.¹, кандидат ветеринарных наук

Еспембетов Б.А.¹, кандидат ветеринарных наук

Сиябеков С.Т.², кандидат ветеринарных наук, профессор

¹Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, г. Алматы, Республика Казахстан

²НАО «Казахский Национальный аграрный университет», г. Алматы, Республика Казахстан

ВЫДЕЛЕНИЕ МИКОБАКТЕРИОФАГА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Аннотация

Попытки применения фагов в практике предпринимались достаточно давно, но появление более эффективных в отношении микобактерий туберкулеза по сравнению с бактериофагами противотуберкулезных препаратов в значительной степени уменьшило интерес исследователей в этой области. Однако, возросшая частота лекарственно устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам, делает тему изучения микобактериофагов вновь актуальной. В статье отработаны методы по выделению микобактериофагов из объектов внешней среды и биологического материала.

Всего по отработанному нами методу было выделено 11 - микобактериофагов, лизирующие атипичные и вирулентные микобактерии из биологического материала.

В результате бактериологического исследования на среде Dubos Agar Base рост колоний из посеянных 67 проб крови - у 3 проявлялся на 25 - 50 день. Из посеянных 28 проб мокроты - 4 культуры на среде с салициловым натрием не росли, что позволило их предварительно отнести к патогенным культурам микобактерий (человеческого или бычьего вида), а остальные 6 культур хорошо росли на указанных средах, что является свидетельством их принадлежности к атипичным микобактериям.

Ключевые слова: туберкулез, микобактериофаг, биологический материал, объекты внешней среды, атипичные микобактерии.

Введение. Проблема ликвидации и профилактики заболевания остается актуальной в связи с широким распространением неспецифических туберкулиновых реакций, наличия скрытых (латентных) форм течения инфекции, случаев повторных вспышек инфекции в ранее оздоровленных хозяйствах [1].

Проблема заключается в том, что в настоящее время нет противотуберкулезных фагов, и поэтому исследования, направленные на их получение являются актуальными и востребованными [2, 3].

Бактериофаги широко распространены в природе. Почти везде, где условия обитания благоприятны для размножения бактерий и актиномицетов, удается обнаружить паразитирующие в их клетках бактериофаги. Их можно обнаружить в организме животных, а также в желудочно-кишечном тракте, на коже и слизистых человека, таким образом, фаги нормальные симбионты тела человека. С.В. Цыганова [4] для выделения бактериофагов

методом обогащения в качестве источников фагов использовали внутренние органы гусей и сточные воды птицеводства [5, 6].

Выделить бактериофаг можно из различных материалов, где могли раньше или в данный момент присутствовать бактерии, на которых выделенный фаг размножается. В настоящее время разработаны различные методы качественного обнаружения фага в исследуемом материале. Но выделение фага из патологического материала крайне ограничено [7, 8].

В связи с этим целью исследования являлось выделения микобактериофагов из биоматериала в перспективе для создания эффективного противотуберкулезного средства.

Материалы и методы. Для выполнения исследований были использованы: пробы, взятые из объектов внешней среды и биологический материал. В качестве индикаторных 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.

Для выделения микобактериофагов из различных биоматериалов были использованы разработанные нами методы.

Для бактериологического исследования были использованы флотационный способ предпосевной обработки (обогащение) по Поттенджера и метод Аликаевой с использованием прибора Ultra-Turrax (IKA, Германия), проведены посевы на яичную питательную среду Dubos Broth Base и Dubos Agar Base.

Результаты и обсуждение. Для выполнения поставленной цели было отобрано 10 проб патологического материала (паренхиматозные органы и лимфоузлы) от крупного рогатого скота и 95 биоматериала (28 - мокрота и 67 - кровь). Предпосевную обработку отобранного патологического материала с целью выделения микобактериофагов проводили методом А.П. Аликаевой, а кровь и мокроту флотационным методом Поттенджера.

При диагностическом убое 10 голов реагировавшего на туберкулин крупного рогатого скота, характерные для туберкулеза изменения выявлены в 4 пробах. Отмечали изменения в заглоточных, бронхиальных и средостенных лимфатических узлах.

Отобранные от каждого в отдельности лимфатические узлы животного измельчали ножницами размером 0,5 см³, затем для получения гомогената использовали оборудование Ultra-Turrax (рисунок 1 а, б, в, г), который используется для диспергирования различных материалов. После этого часть гомогената использовали для получения микобактериофагов путем предварительного культивирования. Для этого 1-2 см³ гомогената после предпосевной обработки, материал вносили в колбы, содержащие 150 см³ жидкой среды и инкубировали течение в 1–2 мес в термостате при 38⁰С, оставшуюся часть пересевали по 0,25 см³ в пробирки со средой Dubos Agar Base и инкубировали при 37⁰С в течение 3-5 суток для цели выделения культур микобактерий.

Затем, используя пастеровскую пипетку, оставшуюся часть от каждого проб измельченного гомогената пересевали по 0,25 см³ по пять в бактериологические пробирки со средой Dubos Agar Base и инкубировали при 37⁰С в течение 3-5 суток для цели выделения культур микобактерий.

Нами проведено бактериологическое исследование 28 проб материала (мокроты) от больных туберкулезом людей разного возраста с целью получения противотуберкулезных фагов.

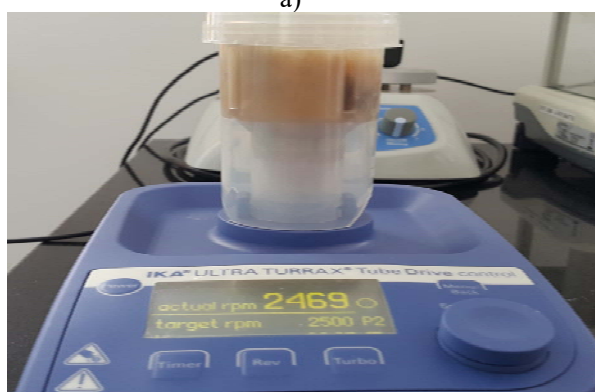
Исследуемый материал помещали в стерильную узкогорлую бутылку вместимостью 200-250 см³ с пробкой. Заливали двойным объемом щелочи и энергично встряхивали в течение 10-15 мин в аппарате для встряхивания. При этом мокрота гомогенизируется, растворяется слизь и гной, освобождаются микобактерии. Затем в эту же бутылку приливали 1 см³ ксилола и 100 см³ дистиллированной воды для разжижения мокроты. Снова встряхивали в течение 10-15 мин для эмульгирования ксилола. Доливали дистиллированную воду до горлышка бутылки. Смесь оставляли при комнатной температуре на 40-50 мин. За это время капельки ксилола с адсорбированными на них микобактериями всплывают, образуя в горлышке бутылки сливкообразное флотационное кольцо.



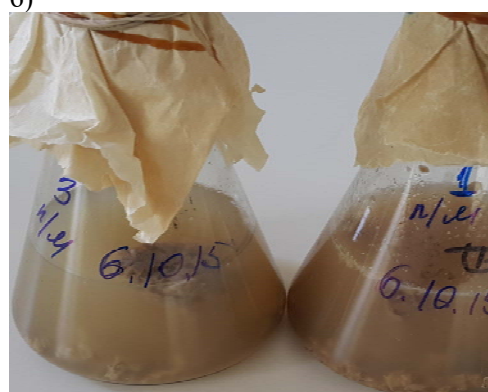
а)



б)



в)



г)

Рисунок 1 - Обработка патологического материала от реагировавших на туберкулин животных

Пенистую часть флотационного кольца переносили пастеровской пипеткой в стерильные пробирки, добавляли равное количество 5%-го раствора щавелевой кислоты. Пробирки тщательно встряхивали в течение 3-5 мин и оставляли на 10 мин. Содержимое вновь образовавшегося флотационного кольца переносили пастеровской пипеткой в пробирки с питательной средой Dubos Agar Base с салициловым натрием и оставшуюся часть флотационного кольца переносили в посуду содержащую жидкую среду Dubos Broth Base (рисунок 2) для дальнейшего выделения микобактериофага. Засеянные пробы помещали в термостат при 37-38⁰С.



Рисунок 2 - Обработка мокроты от больных туберкулезом людей

Нами также проведено бактериологическое исследование 67 проб крови от реагировавших на туберкулин коров выше указанным методом флотации (рисунок 3).



Рисунок 3 - Обработка крови от реагирующих на туберкулин коров

Содержимое образовавшегося флотационного кольца переносили пастеровской пипеткой в пробирки с питательной средой Dubos Agar Base и оставшуюся часть флотационного кольца переносили в посуду содержащую 150 см³ среды Dubos Agar Base (рис. 3) для дальнейшего выделения микобактериофага. Засеянные пробы помещали в термостат при 37-38⁰С. Учет роста колоний из крови проводили через каждые 5-7 суток на протяжении 2-х месяцев.

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.

В качестве индикаторных тест-культур были использованы культуры микобактерий – *M. bovis*-8, *M. M.avium*, *M.scrofulaceum*, *M.intracellulare* выделенные в разные годы из патологического материала и объектов внешней среды.

В результате по отработанному нами методу было выделено 11 - микобактериофагов, лизирующие атипичные и вирулентные микобактерии из биологического материала реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих доставленных из различных областей республики.

В результате бактериологического исследования на среде Dubos Agar Base рост колоний из посеянных 67 проб крови - у 3 проявлялся на 25 - 50 день. Из колоний выросших на плотной питательной среде для культивирования микобактерий готовили мазки, которые окрашивали по методу Циль - Нильсена и исследовали методом световой микроскопии.

В результате из посеянных 28 проб мокроты - 4 культуры на среде Dubos Agar Base с салициловым натрием не росли, что позволило их предварительно отнести к патогенным культурам микобактерий (человеческого или бычьего вида), а остальные 6 культур хорошо росли на указанных средах, что является свидетельством их принадлежности к атипичным микобактериям.

На среде Dubos Agar Base рост колоний из посеянных проб патматериала - у 4 проб проявлялся на 25 - 50 день

Заключение. В результате по выделению микобактериофагов из биологического материала по отработанному нами методу было выделено 11-микобактериофагов, лизирующие атипичные и вирулентные микобактерии из биологического материала реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих доставленных из различных областей республики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Созиков, В. А. Роль атипичных микобактерий в эпизоотическом процессе // Ветеринария. – 1996. – № 3. – С. 27-31.
2. Сырым Н.С., Еспембетов Б.А., Сансызбай А.Р. Новые подходы в терапии туберкулеза // Матер. VIII съезда фтизиатров и пульмонологов Узбекистана. - Ташкент, 2015. –С. 137-138.
3. Сырым Н.С., Еспембетов Б.А. Разработка метода получения микобактериофага // Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности: матер.

международ. науч.-практ. конф., посв. 80-летию заслуженного ученого, профессора В.Л.Зайцева, 2015. – С. 272-276.

4. Цыганова С.В. Выделение бактериофагов против возбудителей бактериальных болезней птиц и изучение их биологических свойств: автореф. канд.вет.наук: 16.00.03. - СПб.-2009.-23 с.

5. Elizabeth Kutter Phage therapy: Bacteriophages as antibiotics. – Olympia: Evergreen State College. – 1997.

6. Gan Y., Wu T. Characterization and classification of Bo4 as a cluster G mycobacteriophage that can infect and lyse *M. Tuberculosis* // Arch. Microbiol. – 2014. – Vol.196. - №3. – P. 209-218.

7. Васильев Д.А., Золотухин С.М. (Бактериофаги микроорганизмов, важных для растений, животных и человека. - Ульяновск, 2013. - 311 с.

8. Вейсфеллер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерии. - Будапешт, 1975. - С.274-295.

ТҮЙІН

Фагтарды практикада қолдану әрекеттері бұрыннан болған, бірақ туберкулезге қарсы препараттардың бактериофагтармен салыстырғанда туберкулез микобактерияларына қатысты неғұрлым тиімділігі осы саладағы зерттеушілердің қызығушылығын айтарлықтай дәрежеде азайтты. Алайда, туберкулезге қарсы препараттарға туберкулез микобактерияларының дәріге төзімді штаммдарының жиілігінің өсуі микобактериофагтарды зерттеу тақырыбын қайтадан өзекті етеді. Мақалада сыртқы орта және биологиялық материал нысандарынан микобактериофагтар бөлу әдістері пысықталды.

Республиканың әр түрлі облыстарынан сүтқоректілерге арналған ППД-туберкулинге оң нәтиже көреткен малдардың биологиялық сынамаларына алынған микобактериофагтарды бөлу бойынша жасалған жұмыстың нәтижесінде біз жасаған әдіспен 11 - микобактериофаг бөлінді.

Dubos Agar Base коректік ортасындағы бактериологиялық зерттеу нәтижесінде, егілген 67 қан сынамасының 3-нің колонияларының өсуі - 25-50 күнде байқалды. Себілген қақырықтың 28 сынамасының 4-еуі салицил натрийі косылған коректік ортада өскен жок, бұл оларды алдын ала микобактериялардың (адам немесе бұқа түрі) патогенді өсіндіге жатқызуға мүмкіндік берді, ал қалған 6 өсінді көрсетілген ортада жақсы өсті, бұл олардың атипті микобактерияларға жататынын айғақтайды.

RESUME

Attempts to use phages in practice have been made for a long time, but the emergence of more effective against *Mycobacterium tuberculosis* compared with bacteriophages anti-TB drugs significantly reduced the interest of researchers in this area. However, the increased frequency of drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* to anti-TB drugs, makes the topic of studying mycobacteriophages relevant again. In the article the methods for the isolation of mycobacteriophages from the objects of the environment and biological material are worked out.

A total of 11 mycobacteriophages lysing atypical and virulent mycobacteria from biological material were isolated according to our method.

As a result of bacteriological study on Dubos Agar Base, the growth of colonies from the seeded 67 blood samples-in 3 showed on day 25 - 50. Of the 28 sputum samples sown, 4 cultures on the medium with salicylic sodium did not grow, which allowed them to be previously attributed to pathogenic mycobacteria cultures (human or bovine species), and the remaining 6 cultures grew well on these media, which is evidence of their belonging to atypical mycobacteria.

УДК 619: 616.995.636

Сырым Н.С.¹, кандидат ветеринарных наук

Еспембетов Б.А.¹, кандидат ветеринарных наук

Сиябеков С.Т.², кандидат ветеринарных наук, профессор

¹Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, г. Алматы, Республика Казахстан

²НАО «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