

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ И КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM BOVIS* 8 И *MYCOBACTERIUM BOVIS VALLEE*

А. Н. ПРИТЫЧЕНКО

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышесесского»,
г. Минск, Республика Беларусь, 220063

(Поступила в редакцию 15.03.2021)

Проблема туберкулёза приобретает особую актуальность в современном мире. Возбудителем болезни инфицировано порядка 40 % людей, ежегодно более 3 млн человек умирает.

*Ввиду высокой патогенности и уникальных свойств возбудителя поражаются многие виды животных и даже холоднокровных, однако крупный рогатый скот болеет чаще всего. Основным видом, играющим эпизоотическое значение является *Mycobacterium bovis*, способный вызывать туберкулёз и у человека [3, 4].*

Благодаря аллергической диагностике, в нашей стране поддерживается устойчивое благополучие по туберкулёзу крупного рогатого скота. В настоящее время на ОАО «БелВитунифарм» для нужд Республики Беларусь выпускают туберкулин очищенный для млекопитающих, производство которого сопряжено с постоянным контролем штаммов.

*Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства производственных штаммов *Mycobacterium bovis* 8 и *Mycobacterium bovis* Vallee соответствуют типовым и обладают способностью продуцировать туберкулопротеины в концентрации 0,52–1,12 мг/мл, что соответствует ТНПА. Приследованные штаммы можно использовать для создания первичных посевных серий в технологическом цикле производства туберкулина очищенного для млекопитающих.*

Ключевые слова: *Mycobacterium bovis*, туберкулин, аллерген, туберкулёз крупного рогатого скота, технология получения туберкулина.

The problem of tuberculosis is of particular relevance in the modern world. The causative agent of the disease is infected with about 40 % of people, every year more than 3 million people die.

*Due to the high pathogenicity and unique properties of the pathogen, many species of animals and even cold-blooded animals are affected, but cattle are most often sick. The main species that plays an epizootic role is *Mycobacterium bovis*, which can cause tuberculosis in humans [3, 4].*

Thanks to the allergic diagnosis, our country maintains a stable well-being for bovine tuberculosis. Currently, JSC "BelVituunifarm" produces tu-berkulin purified for mammals for the needs of the Republic of Belarus, the production of which is associated with constant monitoring of strains.

*The morphological, tinctorial and cultural properties of the *Mycobacterium bovis* 8 and *Mycobacterium bovis* Vallee strains correspond to the typical ones and have the ability to produce tuberculoproteins at a concentration of 0.52–1.12 mg / ml, which corresponds to TNPA. The inherited strains can be used to create primary seed series in the technological cycle of the production of purified tuberculin for mammals.*

Key words: *Mycobacterium bovis*, tuberculin, allergen, bovine tuberculosis, tuberculin production technology.

Введение. В качестве штаммов для производства туберкулина берут *Mycobacterium bovis* 8 и *Mycobacterium bovis* Vallee (резервный) [6].

В мировой практике производители используют преимущественно моноштаммную технологию, но до 1982 г. на Курской биофабрике туберкулин готовили из 3 штаммов *Mycobacterium bovis* №8, №14, Vallee и 2 штаммов *Mycobacterium tuberculosis* Dt/St и №192 [2, 6]. Штаммы *M. bovis* №8 и №14 были выделены в СССР в 30 годы прошлого века от больного крупного рогатого скота, а *M. bovis* Vallee – во Франции [6]. *M. tuberculosis* Dt/St и №192 были получены в 1948 г. из США [2].

В 70–80 гг. МЭБ признало целесообразным готовить туберкулин лишь из штаммов *M. bovis*, так как *M. tuberculosis* повышает концентрацию общеродовых антигенов, и снижает видовую специфичность аллергена [2]. В странах ЕС, США, Южной Америки основным производственным штаммом стал *M. bovis* AN 5, а штамм Vallee – резервным [10, 11, 12]. Тем не менее, не исключается применение других штаммов, отвечающих требованиям к штаммам *M. bovis*. На Курской биофабрике основным штаммом является *M. bovis* №8, как наиболее продуктивный по выходу туберкулопротеинов [2]. Для производства туберкулина в Украине использован полевой штамм *M. bovis*. Нередко туберкулины для медицинских целей готовили из целого набора штаммов одного вида, хотя существенных различий в их антигенном составе не обнаружено. Для приготовления эталона PPD RT 23 (Государственный институт сывороток, Копенгаген) было использовано 77 штаммов *M. tuberculosis* [9], хотя в последующем было установлено, что PPD RT 23 достоверно не отличался от моноштаммных препаратов [7, 8].

Исследования на крупном рогатом скоте и морских свинках показали, что ППД из *M. bovis* №8 и *M. bovis* AN5 не различаются [2, 5]. Вместе с тем прямых данных об их антигенном составе нет, и по вопросу их антигенной идентичности, возникают дискуссии, хотя известно, что у штаммов *M. bovis* №8 и Vallee заметных антигенных различий не обнаружено [5].

На свойства производственных штаммов могут влиять многократные пассажи на питательных средах с переходом к 6–12 генерации в S-форму. Культуральная жидкость S-культур МБТ содержит много белка, но с низкой активностью и видовой специфичностью [1]. Для ста-

билизации свойств производственных штаммов рекомендуется каждые 3–5 лет проводить пассаж на телятах [6].

Исключить диссоциацию производственного штамма МБТ можно ограничением числа пассажей на жидкой среде и использованием принципа «первичной посевной серии». Для этого ВОЗ рекомендует создание большой по объёму и хорошо изученной первичной посевной серии производственного штамма [10]. По мере необходимости, из неё создают вторичные производственные серии, число пассажей которых ограничивается [1, 10, 12]. При наличии диссоциаций происходит изменение не только культуральных, но и морфологических и тинкториальных свойств микобактерий [10]. По международным требованиям производство туберкулина должно вестись с использованием первичной посевной серии производственного штамма [1, 5, 12], что максимально исключает изменение свойств диагностикума из-за процессов адаптации и диссоциации культуры при многократных пересевах на жидкой синтетической питательной среде.

Таким образом, изучение морфологических, тинкториальных и культуральных свойств производственных штаммов *Mycobacterium bovis* 8 и *Mycobacterium bovis* Vallee является актуальной задачей.

Цель работы – изучить морфологические, тинкториальные и культуральные свойства производственных штаммов *Mycobacterium bovis* 8 и *Mycobacterium bovis* Vallee и создать первичные посевные серии.

Основная часть. В качестве объектов исследования использовали штаммы *Mycobacterium bovis* 8 и *Mycobacterium bovis* Vallee, полученные из РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского». Для культивирования штаммов использовали питательные среды: МПА, МПБ, Гельберга, Лёвенштейна-Йенсена, Павловского и Сотона.

Для изучения морфологических и тинкториальных свойств готовили препараты-мазки по классической методике, окрашивали по Цилю-Нильсену и Киньону, микроскопию проводили в световом микроскопе OLYMPUS BX51 с системой видеофиксации DP71.

Культуральные свойства изучали на средах МПА, МПБ, Гельберга, при различных температурных режимах (20, 37 и 45°C), а также на средах Павловского и Сотона. Антигенные свойства изучали иммунопероксидазным методом с использованием аффинно очищенных иммуноглобулинов к *Mycobacterium bovis* BCG. Идентификацию штаммов проводили в полимеразной цепной реакции (ПЦР) по стандартному протоколу.

Для определения содержания туберкулопротеинов использовали методику: 0,5 мл пробы + 2,0 мл H₂O + 2,5 мл 20 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ) – определение % пропускания через 5 мин при 540 нм в сравнении с контролем (2,5 мл H₂O+2,5 мл 20 % ТХУ). Расчёт содержания туберкулопротеинов проводили относительно калибровки, построенной по известным количествам сухого ППД туберкулина.

Все опыты сопровождалось необходимыми контролями.

При изучении культуральных свойств сделаны посевы на различные питательные среды: МПА, Гельберга, Лёвенштейна-Йенсена.

При культивировании на МПА и МПБ при 37 °С, а также при 20 и 45 °С среды оставались стерильными без признаков роста культур.

На средах Гельберга, Лёвенштейна-Йенсена и Павловского штаммы *Mycobacterium bovis* 8 и *Mycobacterium bovis* Vallee формировали типичные колонии при температуре 38°С уже через 3 недели (рис. 1–3).



Рис. 1. Характер роста *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee на среде Гельберга



Рис. 2. Характер роста *M. bovis* 8 на среде Лёвенштейна-Йенсена



Рис. 3. Характер роста штамма *M. bovis* 8 на среде Павловского

На среде Гельберга (рис. 1) культуральные свойства характеризовались интенсивным ростом, мелкими, размером до 4 мм в диаметре, с неровным краем, сухими, непрозрачными, с приподнятым центром, цвета слоновой кости шероховатыми колониями R-формы, зачастую неправильной формы, в последующем образующие сливной рост, приобретающий складчатость. Со временем наблюдалось изменение цвета среды с оливково-зелёного до кремового в виду редукции малахитового зелёного.

На среде Лёвенштейна-Йенсена (рис. 2) культуральные свойства характеризовались менее интенсивным ростом, более мелкими, размером до 4 мм в диаметре, с неровным краем, непрозрачных, также цвета слоновой кости шероховатыми колониями R-формы и сливным ростом. На среде Павловского через 8 недель (рис. 3) культуральные свойства характеризовались мощным ростом с образованием мелких и крупных 2–5 мм в диаметре колоний, с неровным краем, непрозрачных, цвета слоновой кости шероховатыми колониями R-формы. Наиболее быстрый рост проявлялся на среде Павловского, уже через 14 дней культивирования. Это объясняется наилучшими адаптационными условиями для микобактерий на среде Павловского содержащую глицериновый картофель. При микроскопии препаратов-мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену из колоний, полученных на средах Гельберга, Лёвенштейна-Йенсена и Павловского штаммы *Mycobacterium bovis* 8 и *Mycobacterium bovis* Vallee обнаружены типичные рубиново-красные палочки (рис. 4–6).

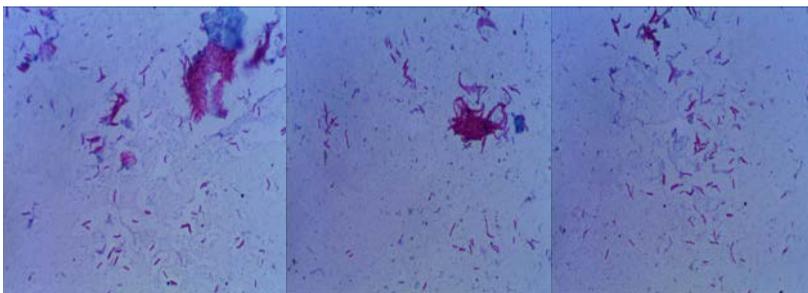


Рис. 4. Морфология и тинкториальные свойства *M. bovis* 8 на среде Гельберга, окраска по Цилю-Нильсену, $\times 1000$

Рис. 5. Морфология и тинкториальные свойства *M. bovis* 8 на среде Лёвенштейна-Йенсена, окраска по Цилю-Нильсену, $\times 1000$

Рис. 6. Морфология и тинкториальные свойства *M. bovis* 8 на среде Павловского, окраска по Цилю-Нильсену, $\times 1000$

Как видно из рис. 4–6, штаммы *Mycobacterium bovis* 8 представляют собой чистые культуры, в которых видно наличие коротких, средних и длинных палочек рубиново-красного цвета на голубоватом фоне, размером до 1,5–7 мкм в длину и 0,3–0,7 мкм в диаметре, располагающихся одиночно, группами, скоплениями в виде формирующихся элементов корд-фактора – жгуты и конгломераты красного цвета (рис. 4–5), что характерно для данных штаммов.

На среде Сотона уже через 3 недели образовывалась лёгкая полупрозрачная нежная плёнка, занимающая всю поверхность среды или распола-

гающаяся в виде островков. В более старшем возрасте культуры росли с образованием обильной сухой складчатой плёнки цвета слоновой кости, заползающей на стенки флакона и образующие мощное пристеночное кольцо, при этом среда остаётся прозрачной, иногда наблюдается образование рыхлого, достаточно мощного осадка, который формируется при оседании плёнки. В процессе роста культур в культуральной жидкости за 8–9 недель происходило накопление 0,53–1,14 мг/мл туберкулопротеинов. При исследовании штамма *Mycobacterium bovis Vallee* получены идентичные результаты по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам, продукция туберкулопротеинов была на уровне 0,51–1,11 мг/мл, что укладывается в нормативные показатели.

Культуры микобактерий *Mycobacterium bovis* 8 и *Mycobacterium bovis Vallee* были идентифицированы в ПЦР, а также исследованы в иммунопероксидазном методе с аффинно очищенными иммуноглобулинами к *Mycobacterium bovis* BCG. При микроскопии препаратов-мазков обнаружены морфологически типичные микобактерии бычьего типа, специфически окрашенные в коричневатый цвет.

Заключение. Исследованные штаммы по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам соответствуют характеристикам вида, идентифицированы в высокоспецифических тестах и способны продуцировать туберкулопротеины в достаточно высокой концентрации. Продукция туберкулопротеинов была на уровне для *Mycobacterium bovis* 8 – 0,53–1,14 мг/мл и для *Mycobacterium bovis Vallee* – 0,51–1,11 мг/мл. Данные штаммы можно использовать для создания первичных посевных серий в технологическом цикле производства туберкулина очищенного для млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ауштрова, К. Н. Оптимизация системы подготовки производственных штаммов возбудителя туберкулёза при изготовлении очищенного туберкулина для млекопитающих: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / К. Н. Ауштрова; Всесоюзный государственный научно-контрольный институт. – М., 1991. – 21 с.
2. Козлов, В. Е. Аллергены для диагностики туберкулёза: совершенствование производства и стандартизация: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 16.00.03; 03.00.23 / В. Е. Козлов; ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» – Москва, 2007. – 43 с.
3. Лысенко А. П., Власенко В. В., Красникова Е. Л., Леминш А. П., Аксенчик М. А., Притыченко А. Н. Вирус бычьего лейкоза – вирусоподобная форма микобактерий туберкулёза? Экология и животный мир. – 2019. – №1. – С. 15–25.
4. Притыченко, А. Н. Аллергическая активность и специфичность препаратов туберкулина с 30–50 % слабосекретирующих антигенов микобактерий туберкулёза / А. Н. Притыченко, А. П. Лысенко, М. В. Кучвальский, Е. Л. Красникова // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2020. – Т. 58. – № 4. – С. 472–482.

5. Притыченко, А. Н. Туберкулин очищенный для млекопитающих (оптимизация очистки, диагностические и иммунохимические свойства): автореф. дис. ... канд. вет. наук :16.00.03 / А. Н. Притыченко; БНИИ экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеселского. – Минск, 2002. – 17 с.
6. Юсковец, М. К. Туберкулёз сельскохозяйственных животных и птиц / М. К. Юсковец. – Минск: Ураджай, 1963. – 448 с.
7. Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle / J.M. Pollock [et al.] // *Veter. Rec.* – 2000. – Vol. 146, № 23. – P. 659–665.
8. Harboe, M. Antigens of old tuberculin and autoclaved *M. bovis* BCG / M. Harboe // *Amer. Rev. Resp. Dis.* – 1984. – Vol. 124, № 1. – P. 124–127.
9. Magnusson, M. Preparation of purified tuberculin RT 23 / M. Magnusson, M. W. Bentzon // *Bulletin of the World Health Organization.* – 1958. – Vol. 19. – P. 46–63.
10. Palmer, D. N. Bovine tuberculosis in OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th ed. / D. N. Palmer // *World Organisation for Animal Health, France* [Electronic resource] – 2004. – Mode of access: http://www.oie.int/eng/normes/en_mmanual.htm. 22. – Date of access: 23.07.2004.
11. World Animal Health in 1995. Reports on the animal health status and disease control methods and list a disease outbreaks – statistics. Reports are presented in English, French, Spanish or Russian / Office International des Epizooties. – Brucel, 1995. – Part 1. – P. – 348.
12. World Health Organization (WHO) Requirements for Biological Substances, Annex: Requirement for Tuberculin: technical Report Series. – WHO, Geneva, 2005. – 1102 p.