

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКОБАКТЕРИЙ ПАРАТУБЕРКУЛЕЗА

Ионина С.В.

Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук
Новосибирская область, р.п. Краснообск, Россия

Для цитирования: Ионина С.В. Культивирование микобактерий паратуберкулеза // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2019. Т. 49. № 2. С. 64–69, DOI: 10.26898/0370-8799-2019-2-8

For citation: Ionina S.V. Kul'tivirovanie mikobakterii paratuberkuleza [Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*]. *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki* [Siberian Herald of Agricultural Science], 2019, vol. 49, no. 2, pp. 64–69, DOI: 10.26898/0370-8799-2019-2-8

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

Представлена новая плотная питательная среда для культивирования микобактерий паратуберкулеза, состоящая из органических и неорганических ингредиентов. В лабораторных условиях проведены исследования диагностической информативности и эффективности плотных питательных сред, используемых для культивирования микобактерий паратуберкулеза. В состав разработанной среды в качестве минерально-солевой основы введена вытяжка из золы древесины березы 3%-й концентрации и стимулятор роста биологического происхождения – оксидат торфа. При конструировании испытываемой среды в качестве аналога использовали яичную питательную среду Левенштейна-Йенсена с добавлением микобактина, который представляет собой вытяжку из *Mycobacterium phlei* и содержит вещества, необходимые для питания и размножения *Mycobacterium paratuberculosis* на искусственных питательных средах. Проверку питательных сред на совместимость и растворимость компонентов проводили в дистиллированной воде в соответствии с общепринятыми методическими рекомендациями. Длительность наблюдения составила от 60 до 90 дней. Приведено сравнение сроков появления первичного и интенсивного роста микобактерий паратуберкулеза на опытной среде и контрольной среде Левенштейна-Йенсена с микобактином. Колонии первичного и интенсивного роста стандартизированного штамма *M. paratuberculosis* и изолята *M. paratuberculosis*, выделенного из биоматериала крупного рогатого скота, на опытной яичной питательной среде появились на 3–7 сут быстрее, чем на контрольной среде Левенштейна-Йенсена с микобактином. При посеве биоматериала (лимфатические узлы и кишечник) от крупного рогатого скота первичный рост *M. paratuberculosis* на опытной среде отме-

CULTIVATION OF MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS

Ionina S.V.

Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Bio-Technologies of the Russian Academy of Sciences
Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

The paper presents a new solid growth medium for the cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* consisting of organic and inorganic ingredients. The study of diagnostic informative value and effectiveness of solid growth media used for cultivation of *Mycobacterium Paratuberculosis* was carried out in the laboratory conditions. Extract from birch-wood ash of 3% concentration and a growth stimulant of biological origin, peat oxide, were introduced as a mineral salt bases into the developed medium. When constructing the test medium, Lowenstein–Jensen egg growth medium with the addition of mycobactin, which is an extract from *Mycobacterium. phlei* and contains substances necessary for the nutrition and reproduction of *Mycobacterium paratuberculosis* on artificial nutrient media, was used as an analogue. A test on compatibility and solubility of the components was done in distilled water in accordance with the generally accepted guidelines. The duration of observation ranged from 60 to 90 days. A comparison was made between the time of appearance of the primary and intensive growth of mycobacteria of paratuberculosis on the experimental medium and the Lowenstein–Jensen control medium with mycobactin. Colonies of primary and intensive growth of standardized *M. paratuberculosis* strain and *M. paratuberculosis* isolate obtained from the cattle biomaterial on experimental egg growth medium appeared 3-7 days faster than on Lowenstein–Jensen control medium with mycobactin. When inoculating biomaterial from cattle (lymph nodes and intestine), the primary growth of *M. paratuberculosis* on the experimental medium was noted 7 days earlier than on the control one, and the intensive growth was 3 days earlier. The ex-

чен на 7 сут раньше, чем на контрольной, интенсивный рост – на 3-е суток. Опытная питательная среда дешевле и проще в процессе приготовления, чем контрольная среда Левенштейна-Йенсена с использованием микобактина, приготовление которого является достаточно трудоемким технологическим процессом.

Ключевые слова: паратуберкулез, микобактерии, питательные среды, первичный рост, интенсивный рост

ВВЕДЕНИЕ

Клинические симптомы и патологоанатомическая картина паратуберкулеза впервые были описаны в XIX в. Название болезни *Johnie* происходит из работ Н.А. Johnie и L. Frothingham, которые в 1895 г. продемонстрировали связь между энтеритом крупного рогатого скота и наличием не кислотоустойчивых микроорганизмов в участках слизистой оболочки кишечника. В 1906 г. О. Bang установил различие между туберкулезным и нетуберкулезным энтеритом и предложил, что последний можно назвать псевдотуберкулезным энтеритом. Идентификация этиологического агента приписывается F.W. Twort, которому в 1912 г. удалось культивировать и охарактеризовать микобактерии, которые в 1914 г. были использованы, чтобы воспроизвести экспериментальный энтерит. После полной характеристики *Mycobacterium paratuberculosis* в качестве отдельного вида внутри рода *Mycobacterium*, болезнь была переименована в паратуберкулез [1, 2].

Инфекции, вызванные *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), к группе которых относится паратуберкулезный энтерит, могут быть скрыты и не проявляться у животных в течение многих лет, но в какой-то момент у них начинают проявляться клинические признаки инфекции. Инкубационный период при этом находится в обратной зависимости от объема инфицирования и может быть очень длительным. Паратуберкулез может иметь различные формы проявления болезни: от форм с высокой распространенностью и значительной смертностью к случаям с очень низкой распространенностью и невысокой заболеваемостью и смертностью. Постановка диагно-

perimental growth medium is cheaper and simpler to prepare than Lowenstein–Jensen control medium with mycobactin, whose preparation is a rather laborious technological process.

Keywords: paratuberculosis, mycobacteria, growth media, primary growth, intensive growth

за на паратуберкулез, преимущественно в латентной стадии инфекции, является проблемой, так как скрытое течение приводит к различной интерпретации имеющихся симптомов. Факторы, которые могут повлиять на скорость прогрессирования или восстановления от инфекции, пока невозможно установить [3–5]. Выделение возбудителя паратуберкулеза лабораторными методами – достаточно затруднительная задача, так как *Mycobacterium paratuberculosis* очень медленно растущий привередливый микроорганизм: пролиферация многих штаммов требует присутствия специфического фактора роста – микобактина. Формирование видимых колоний на твердых средах может потребовать до 4 месяцев, независимо от присутствия различных добавок. В то время как зависимость от металлов для роста является общим признаком всех бактерий, особенность потребности в железе патогенных микобактерий заключается в том, что для поглощения и утилизации этого металла необходим органический источник. При этом нельзя определить вид микобактерий с помощью только одного теста. Только после проведения многократных испытаний со специфическими маркерами (факторы роста, ингибиторы роста, специфические ферменты, липиды рестрикционного анализа ДНК, диапазон патогенности) выделенный из животного источника микроорганизм, может классифицироваться как *M. paratuberculosis* [6, 7].

Для выявления больных животных используют разработанные в разные годы методы микробиологической диагностики. Однако ни один из них в отдельности на ранней стадии паратуберкулезного процес-

са не позволяет выявить инфицированных животных. Диагноз считают установленным при обнаружении в органах больных животных характерных для паратуберкулеза изменений или при выделении возбудителя из различного биологического материала. Данные причины приводят к сложностям при разработке усовершенствованных специфических средств диагностики паратуберкулеза. Следовательно, дальнейшая разработка более совершенных методов диагностики этого заболевания остается актуальной на настоящий момент¹ [8, 9].

Цель исследований – разработать яичную питательную среду, используя минерально-солевую основу и стимулятор роста биологического происхождения, для культивирования микобактерий паратуберкулеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В лаборатории туберкулеза сельскохозяйственных животных Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибирского федерального научного центра агроботехнологий Российской академии наук (ИЭВС и ДВ СФНЦА РАН) проведены научные исследования по разработке новой яичной питательной среды для проведения культивирования микобактерий паратуберкулеза. Для достижения поставленной задачи по повышению диагностической информативности в составе разработанной среды, в качестве минерально-солевой основы, которая является одним из важных составляющих питательных сред, была использована вытяжка из золы древесины березы 3%-й концентрации и стимулятор роста биологического происхождения – оксидат торфа. Использование вытяжки древесной золы было обусловлено тем, что при проведении спектрального анализа в ее составе были обнаружены все элементы (калий, натрий, железо, цинк и другие), необходимые

для питания микобактерий, в качестве источника углерода ввели глицерин [10].

Для достижения оптимальных сроков роста микобактерий на питательных средах необходимо введение дополнительных элементов – факторов роста, которыми могут быть добавки природного происхождения: экстракты и вытяжки² [11]. При конструировании опытной среды таким фактором роста явился оксидат торфа, представляющий собой комплекс из макро- и микроэлементов (железо, йод, кобальт, медь, кальций, магний, селен, цинк, натрий) и гуматов – продуктов взаимодействия бурого угля с водным раствором щелочи. В результате образуются легко растворимые в воде элементы, такие как гумат натрия или гумат калия, которые обладают физиологически активными свойствами, необходимыми для роста и развития микроорганизмов.

При конструировании испытуемой среды в качестве аналога использовали яичную питательную среду Левенштейна-Йенсена с добавлением микобактина, который представляет собой вытяжку из *M. phlei* и содержит вещества, необходимые для питания и размножения *M. paratuberculosis* на искусственных питательных средах. Приготовление сред проводили с проверкой на совместимость компонентов и их растворимость в дистиллированной воде³.

С целью исследования диагностической информативности опытной среды в качестве контроля использовали среду Левенштейна-Йенсена с микобактином, на которую проводили посев 3-недельного эталонного штамма *M. paratuberculosis* (Центрально-Любинский) и изолята *M. paratuberculosis*. Изолят выделили из биологического материала (кишечник и лимфатические узлы) от 10 голов крупного рогатого скота (КРС), положительно реагирующих на внутрикожное введение ППД-туберкулина для млекопитающих [12]. Биоматериал был обработан методом А.П. Аликаевой⁴.

¹ Алиев А.П., Фадеева Н.Г. Выделение микобактерий паратуберкулеза из патологического материала // Способы и средства диагностики и борьбы с туберкулезом, бруцеллезом и паратуберкулезом сельскохозяйственных животных: бюллетень ВИЭВ. М., 1990. Вып. 73–74. С. 71–76.

² Пригода А.С., Муратов В.С. Современное состояние и перспективы получения и использования питательных сред. М.: ВНИИ СЭНТИ, 1989. 55 с.

³ Методические рекомендации по изготовлению и использованию питательных сред и растворов для микробиологических целей, культивирования клеток и вирусов. М.: Медицина, 1986. 69 с.

⁴ Байрак В.А., Беляев В.М., Гительсон С.С. Практикум по ветеринарной микробиологии. М.: Колос, 1980. 216 с.

Из культур микобактерий готовили суспензию по стандарту мутности 500 млн кл./мл и засеивали в пробирки со средами по 1 мл. Для посевов использовали по 10 пробирок контрольной и опытных сред.

Длительность наблюдения составила от 60 до 90 дней. Для выявления роста микобактерий пробирки с посевами просматривали через каждые 2 дня в течение первых 14 дней опыта, затем 1 раз в неделю.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Научные исследования по созданию плотной питательной среды для культивирования микобактерий паратуберкулеза проводятся в лаборатории туберкулеза сельскохозяйственных животных ИЭВС и ДВ с 2007 г. При конструировании данной среды использовали различные ингредиенты. В результате проведенных исследований был отобран вариант, в котором в качестве заменителя ростового фактора – микобактина, использовали оксидат торфа с добавлением его в 3%-ю вытяжку из золы древесины березы, оптимальная концентрация которой для роста микобактерий паратуберкулеза была установлена опытным путем.

В процессе исследований по разработке состава плотной питательной среды использовали вещества органического и неорганического происхождения в различных концентрациях и соотношениях (10 вариантов). В результате был сконструирован окончательный вариант, включающий следующие компоненты в указанном соотношении:

Яйца куриные	4–5 шт.
3%-я вытяжка древесной золы	100 мл
2%-й водный раствор малахитовой зелени	4 мл
Глицерин	2,0 г
Оксидат торфа	2,0 г

Приготовление среды. Куриные яйца (4–5 шт.) моют щеткой с мылом и обрабатывают спиртом. Стерильным пинцетом разбивают яйца и выливают в стерильную колбу с бусами. Колбу встряхивают несколько минут после добавления каждого яйца до образования однородной массы. Добавляют 4 мл 2%-го раствора малахитовой зелени и вводят в качестве солевой основы 100 мл 3%-й вытяжки древесной золы. В качестве биологически-активной добавки в питательную среду вводят оксидат торфа (Стимулятор роста растений «Оксидат торфа Универсальный» ТУ 88 БССР 135–88). Фильтруют через марлевый фильтр и помещают в аппарат для свертывания и инактивирования сыворотки АСИС при температуре 85 °С в течение 30 мин, предварительно разливая по 4–5 мл среды в пробирки.

Проведенные исследования по изучению диагностической информативности опытной яичной питательной среды и контрольной питательной среды Левенштейна-Йенсена с использованием микобактина показали, что первичный рост эталонного штамма *M. paratuberculosis* и изолята *M. paratuberculosis*, выделенного из биоматериала КРС, на опытной среде проявился на 5-е сутки, на контрольной среде – на 8-е сутки; интенсивный рост был отмечен на 13-е и 20-е сутки соответственно.

При исследовании диагностической эффективности опытной и контрольной сред первичный рост *M. paratuberculosis* при посеве биоматериала от КРС на опытной среде наблюдали на 13-е сутки, на контрольной – на 20-е сутки, интенсивный рост был отмечен на 23-е и 26-е сутки соответственно (см. таблицу).

Рост колоний микобактерий паратуберкулеза, сут
Growth of mycobacteria colonies of paratuberculosis, days

Питательные среды	Эталонный штамм <i>M. paratuberculosis</i>		Изолят <i>M. paratuberculosis</i> из биоматериала КРС		Биоматериал от КРС	
	первичный	интенсивный	первичный	интенсивный	первичный	интенсивный
Левенштейна-Йенсена с микобактином	8	20	8	20	20	26
Опытная	5	13	5	13	13	23

ВЫВОДЫ

1. Колонии первичного и интенсивного роста эталонного штамма *M. paratuberculosis* и изолята *M. paratuberculosis*, выделенного из биоматериала крупного рогатого скота, на опытной яичной питательной среде появились на 3–7 сут быстрее, чем на контрольной среде Левенштейна-Йенсена с микобактерином. При посеве биоматериала (лимфатические узлы и кишечник) от крупного рогатого скота первичный рост *M. paratuberculosis* на опытной среде отмечен на 7 сут раньше, чем на контрольной, а интенсивный рост – раньше на 3-е суток. Выявлено, что опытная яичная питательная среда обладает большей диагностической информативностью и эффективностью для определения скорости первичного и интенсивного роста *M. paratuberculosis*, чем контрольная. Опытная питательная среда дешевле и проще в процессе приготовления, чем контрольная среда Левенштейна-Йенсена с использованием микобактерина, приготовление которого является достаточно трудоемким технологическим процессом.

2. В лаборатории туберкулеза сельскохозяйственных животных ИЭВС и ДВ СФНЦА РАН сконструирована новая плотная питательная среда для культивирования микобактерий паратуберкулеза, в состав которой входят куриные яйца, 3%-я вытяжка золы древесины березы, глицерин и оксидат торфа, представляющий собой биологическую добавку. На данную среду получен патент «Питательная среда для культивирования микобактерий паратуберкулеза» № 2439146 от 10 января 2012 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cocito C., Gilot Ph., Coene M., Kesse de M., Poupard P., Vannuffel P. Paratuberculosis // *Clinical microbiology reviews*. 1994, Vol. 7(3), P. 328–345.
2. Ху Б. Распространение и методы диагностики паратуберкулеза у крупного рогатого скота в России (обзорная статья) // *Успехи современной науки и образования*. 2016. Т. 4. № 6. С. 135–141.
3. Whittington R.J. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium*

avium subsp *paratuberculosis* in animal populations // *Australian Veterinary Journal*. 2001. Vol. 79(4). P. 267–278. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2001.tb11980.x

4. Гулюкин М.И., Клименко А.И., Овдиенко Н.П. Микобактерии и микобактериальные инфекции животных: монография. СПб.: Лань, 2018. 304 с.
5. Nielsen S.S., Toft N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques // *Veterinary Microbiology*. 2008. Vol. 129, Is. 3–4, P. 217–235. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.12.011.
6. Jenkins P.A. Lipid analysis in the identification of mycobacteria-an appraisal // *Rev. Infect. Dis.* 1981. Vol. 3. P. 862–866. DOI:10.1093/clinids/3.5.862
7. Jenkins P.A., Pattyn S.R., Portaels F. Diagnostic bacteriology // *The biology of the mycobacteria*. New York. Academic Press, Inc., 1982. Vol. 1. P. 441–470.
8. Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Устинова Г.И., Гулюкин М.И. Проблемы диагностики микобактериальных инфекций крупного рогатого скота // *Ветеринария*. 2014. № 6. С. 3–8.
9. Ионина С.В., Донченко Н.А., Донченко В.Н. Культивирование микобактерий // *Ветеринария*. 2013. № 1. С. 60–61.
10. Завгородний А.И., Позмогова С.А., Гурка М.А. Изучение культурально-морфологических, биохимических и биологических свойств выделенных культур *M. paratuberculosis* // *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. 2014. № 9 (119). С. 93–97.
11. Иерусалимский Н.Д. Основы физиологии микроорганизмов: монография. М.: Издательство АН СССР, 1963. 244 с.
12. Ионина С.В., Дымова М.А., Филипенко М.Л., Донченко Н.А. Генетическое разнообразие изолятов *Mycobacterium avium*, циркулирующих на территории Западной Сибири // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. 2015. № 4 (28). С. 31–37.

REFERENCES

1. Cocito C., Gilot Ph., Coene M., Kesel de M., Poupard P., Vannuffel P. Paratuberculosis. *Clinical microbiology reviews*, 1994, vol. 7(3), pp. 328–345.

2. Khu B. Rasprostraneniye i metody diagnostiki paratuberkuleza u krupnogo rogatogo skota v Rossii (obzornaya statya) [Distribution and methods of diagnostics paratuberculosis (review article)] *Uspekhi sovremennoy nauki i obrazovaniya* [Success of Modern Science and Education], 2016, vol. 4, no. 6, pp. 135–141. (In Russian).
3. Whittington R.J. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in animal populations. *Australian Veterinary Journal*. 2001, vol. 79(4), pp. 267–278. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2001.tb11980.x
4. Gulukin M.I., Klimenko A.I., Ovdienko N.P. *Mikobakterii i mikobakterial'nyye infektsii jyvotnykh* [Mycobacteria and mycobacterial infections of animals] Sankt-Peterburg, Lan'Publ., 2018, 304 p. (In Russian).
5. Nielsen S.S., Toft N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*, 2008, vol. 129, Is. 3–4, pp. 217–235. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.12.011.
6. Jenkins P.A. Lipid analysis in the identification of mycobacteria-an appraisal. *Rev. Infect. Dis*, 1981, vol. 3, pp. 862–866. DOI:10.1093/clinids/3.5.862
7. Jenkins P.A., Pattyn S.R., Portaels F. Diagnostic bacteriology. *The biology of the mycobacteria*, New York, Academic Press, Inc., 1982, vol. 1, pp. 441–470.
8. Naymanov A. Kh., Tolstenko N.G., Vangel' E.P., Ustinova G.I., Gulukin M.I. Problemy diagnostiki mikobakterial'nykh infektsii krupnogo rogatogo skota [The problems of the diagnosis of the mycobacterial infections of the cattle]. *Veterinariya* [Veterinary], 2014, no. 6, pp. 3–8. (In Russian).
9. Ionina S.V., Donchenko N.A., Donchenko V.N. Kul'tivirovanie mikobakteriy [Cultivation of mycobacteria]. *Veterinariya* [Veterinary], 2013, no. 1, pp. 60–61. (In Russian).
10. Zavgorodniy A.I., Pozmogova S.A., Girka M.A. Izuchenie kul'tural'no-morfologicheskikh, biokhimicheskikh i biologicheskikh svoystv vydelennykh kul'tur *M. paratuberculosis* [Study of cultural and morphological, biochemical and biological features of isolated cultures of *M. paratuberculosis*]. *Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Bulletin of Altai State Agrarian University], 2014, no. 9 (119), pp. 93–97. (In Russian).
11. Ierusalimskiy N.D. *Osnovy fiziologii mikroorganizmov* [Bases of microorganisms' physiology]. Moscow, AN SSSR Publ., 1963, 244 p. (In Russian).
12. Ionina S.V., Dymova M.A., Filipenko M.L., Donchenko N.A. Geneticheskoe raznoobrazie izolyatov *Mycobacterium avium*, sirkuliruyushchikh na territorii Zapadnoy Sibiri [Genetic diversity of isolates of *Mycobacterium Avium* circulating on the territory of Western Siberia]. *Aktual'nyye voprosy veterinarnoy biologii* [Actual questions of veterinary biology], 2015, no. 4, pp. 31–37. (In Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

✉ **Ионина С.В.**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник; **адрес для переписки:** Россия, 630501, Новосибирская область, р.п. Краснообск; СФНЦА РАН, а/я 463; e-mail: labtub@mail.ru

AUTHOR INFORMATION

✉ **Ionina S.V.**, Candidate of Science in Biology, Lead Researcher; **address:** PO Box 463, SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, 630501, Russia; e-mail: labtub@mail.ru

Дата поступления статьи 26.02.2019
Received by the editors 26.02.2019