

УДК:619:616.988:636.1

А.К. МУСАЕВА, Н.Н. ЕГОРОВА

## КОЛЛЕКЦИЯ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ В ТОО «КАЗАХСКИЙ НАУЧНО - ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ВЕТЕРИНАРНЫЙ ИНСТИТУТ»

*ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт», г. Алматы*

Ключевые слова: культура, микроорганизмы, коллекция, инфекционные заболевания, штаммы, паспорта, хранение.

Кілттік сөздер: өсінділер, микроағзалар, коллекция, инфекциялық аурулар, штаммдар, паспорттар, сақтау.

Keywords: culture, microorganisms, collection, infectious diseases, strains, passports, storage.

### *Аннотация*

*Цель работы* - поддержание в биологически активном состоянии микроорганизмов различной номенклатуры, выделение эпизоотических культур микроорганизмов, их идентификация.

*Методы исследований.* При проведении работы использовали патологоанатомические, бактериологические, серологические, биохимические методы исследований.

*Результаты работы.* Сохранена жизнеспособность коллекционных штаммов микроорганизмов, их высокая биологическая активность и стабильность исходных биологических свойств. Коллекция пополнена вновь выделенными штаммами микроорганизмов различной номенклатуры из эпизоотических очагов во время вспышек инфекционных заболеваний. В республиканскую коллекцию микроорганизмов депонированы эпизоотические штаммы микроорганизмов с изученными биологическими свойствами для пополнения генетических ресурсов РК.

*Область применения результатов* Штаммы микроорганизмов используются в качестве производственных и контрольных в научных учреждениях при выполнении НИР и для приготовления и контроля биологических препаратов.

### *Выводы:*

1. Сохранена коллекция культур зоопатогенов – возбудителей инфекционных болезней животных и человека, в том числе и особо опасных.

2. Коллекция культур микроорганизмов Института пополнена вновь выделенными штаммами микроорганизмов, циркулирующими в различных по своей характеристике эпизоотических очагах.

3. Пополнены генетические ресурсы страны за счет депонирования в республиканскую коллекцию микроорганизмов вновь выделенных культур с изученными биологическими свойствами.

4. Соблюдение безопасности хранения микроорганизмов позволяет предотвратить угрозу распространения патогенных агентов бактериального и вирусного происхождения за пределы института.

### *Аннотация*

*Жұмыстың мақсаты* – әртүрлі туыстастыққа жататын микроағзаларды биологиялық белсенді калпында сақтау, эпизоотиялық микроағзалар өсінділерін бөліп алу, оларды бірдейлендіру.

*Зерттеулердің әдістері.* Жұмыстарды жүргізу барысында патологанатомиялық, бактериологиялық, серологиялық және биохимиялық әдістер қолданылды.

*Жұмыстардың нәтижелері.* Микроағзалардың коллекциялық штамдарының өміршеңдігі сақталған, олардың биологиялық белсенділігі жоғары және бастапқы биологиялық қасиеттері сақталған. Инфекциялық аурулардың эпизоотиялық ошақтарынан

бөлініп алынған әртүрлі туыстастыққа жататын микроағзалар штамдарымен коллекция толықтырылған. Республикалық микроағзалар коллекциясына биологиялық қасиеттері зерттелген микроағзалар депондалған.

*Нәтижелердің қолданылу аясы* Микроағзалар штамдары ғылыми мекемелерде ғылыми-зерттеу жұмыстардың орындалу барысында өндірістік және тексеру мақсаттарында, биологиялық препараттар дайындау үшін қолданылады.

*Қорытындылар:*

1. Малдар мен адамдардың қауіпті және аса қауіпті инфекциялық ауруларының қоздырғыштары – зоопатогендер өсінділерінің коллекциясы сақталған.

2. Микроағзалар өсінділерінің институттық коллекциясы әртүрлі эпизоотиялық ошақтарда айналымда жүрген микроағзалардың жанадан бөлініп алынған өсінділерімен толықтырылған.

3. Еліміздің генетикалық ресурстары жаңадан бөлініп алынған, биологиялық қасиеттері зерттелген микроағзалардың штамдарын республикалық микроағзалар коллекциясына депондау арқылы толықтырылған.

4. Микроағзаларды сақтау қауіпсіздігі бактериялық және вирустық патогенді агенттердің институт қабырғасынан сыртқа шықпауын қамтамасыз етеді.

На территории Республики Казахстан расположены многочисленные природные очаги многих инфекционных болезней животных и человека. В результате мониторинговых исследований эпизоотических очагов на территории республики ежегодно в лаборатории Казахского научно-исследовательского ветеринарного института (КазНИВИ) поступает до нескольких десятков штаммов возбудителей зоонозных инфекций, изолированных от различных видов животных и объектов окружающей среды.

Ежегодно коллекция культур микроорганизмов института пополняется новыми штаммами микроорганизмов, циркулирующими в различных эпизоотических очагах. После подробных лабораторных исследований наиболее перспективные культуры передаются в музей живых культур микроорганизмов института в лабораторию эпизоотологии и генофонда микроорганизмов, где они пересеваются и хранятся, которые используются авторами при разработке средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний у животных.

В коллекции культур микроорганизмов института хранятся бактерии, вирусы, культуры клеток, простейшие, фаги. Задачей коллекции является сохранение жизнеспособности микроорганизма, его биологических свойств в стабильном исходном состоянии, недопущении изменчивости, реверсии и старения культуры. При пересевах учитывается природа и стабильность штамма, условия культивирования, способ и температура хранения, реактивации. Морфологическая вариабельность микроорганизмов зависит также от состава и качества используемых при пересевах питательных сред.

Разработка теории и практики создания и поддержания коллекций штаммов микроорганизмов является актуальной задачей как в академическом плане (для сохранения биоразнообразия), так в прикладном – для обеспечения фундаментальных исследований, в том числе при разработке ветеринарных и биологических препаратов [1,2]. Значение коллекционирования в этом случае следует рассматривать как научную деятельность, направленную на сбор, оценку свойств, в том числе систематизацию сведений, и обеспечение жизнеспособности штаммов возбудителей инфекций с целью их долгосрочного хранения [3,4].

В целом в лаборатории эпизоотологии и генофонда микроорганизмов (музей культур микроорганизмов) на основании представленных паспортов решается вопрос о ценности штамма для его дальнейшего хранения в коллекции.

Для хранения отбираются:

-Типичные и атипичные штаммы микроорганизмов, изолированные из различных объектов в пределах Казахстана для поддержания микробного генофонда Республики Казахстан.

-Референтные штаммы – из серии типичных, гомологичных и закономерно циркулирующих штаммов, характеризующих популяцию возбудителя на определенной территории, объекте и т. п.

-Тест-штаммы для стандартизации и контроля лабораторных методов, иммунобиологических препаратов и сред – из серии штаммов, отобранных в результате экспериментальных научных и практических исследований.

-Производственные штаммы – из серии штаммов, отобранных для производственных целей (вакцина, иммунобиологические препараты).

-Депонированные штаммы – из серии штаммов, представляющих интерес как охраноспособные (объект патентования) или авторские (объект депонирования).

-Генетически маркированные штаммы и их генетические конструкции – из серии штаммов, отобранных в результате экспериментальных научных и практических исследований.

Таксономическое распределение микроорганизмов, хранящихся в коллекции и выделяемых из очагов инфекций, проводится согласно определителю бактерий Берджи, 1997; *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology /Department of Microbiology and Molecular Genetics: Michigan State University: USA, 2005* [5, 6].

Ежегодно коллекция пополняется новыми образцами микроорганизмов, выделенными из эпизоотических очагов во время вспышек инфекций. При выделении культур микроорганизмов учитывали эпизоотические особенности течения инфекционного процесса, а именно степень его распространения, вид животного или объекта, от которого выделен возбудитель, тяжесть течения инфекционного процесса, степень его проявления, сезонность и т.д.

Выделенные в других лабораториях института культуры передаются в музей после пересевов в пяти пробирках на плотных или жидких питательных средах (запаянных, либо укупоренных парафинированными ватно-марлевыми пробками) с подготовленными паспортами штаммов и картой хранения.

При выделении культур микроорганизмов в лаборатории эпизоотологии и генофонда микроорганизмов при вскрытии абортированных плодов, трупов животных, павших от сальмонеллеза, колибактериоза, пастереллеза, листериоза, бруцеллеза и других инфекций изучали патологоанатомические изменения по общепринятой методике. От трупов животных и абортплодов исследовали паренхиматозные органы с учетом наибольшей локализации возбудителей (печень с желчным пузырем, лимфатические узлы, селезенку, измененные участки легких, почку, трубчатую кость с костным мозгом); бруцелл (желудок, лимфатические узлы, костный мозг). Биохимические свойства культур определяли по их способности ферментировать углеводы (с образованием кислоты и газа), мочевины, аминокислоты, продуцировать ацетилметилкарбинол, утилизировать малонат натрия, использовать цитраты, образовывать сероводород и индол.

Патматериал от животных, павших от анаэробных инфекций, высевали на среду Китт-Тароцци. Спорообразование изучали микроскопией мазков. Изучение патогенности свежевыделенных культур проводили комплексно на лабораторных животных. Для постановки биопробы использовали белых мышей, морских свинок и кроликов.

Изучение свойств полученных культур начинали в короткие сроки после их выделения. Лишь изучение свежевыделенных культур дает возможность составить объективное представление об особенностях свойств природных популяций возбудителей инфекций. Одним из основополагающих моментов коллекционирования является определение типичности или атипичности свойств изолированных культур. Типичные формы возбудителей инфекций имеют определенные признаки, изучение которых начинали уже в момент выделения (например, при микроскопии мазков-отпечатков, определения формы колоний - S, R, M) [7].

В лаборатории подробно изучали все основные свойства выделенных культур: культурально-морфологические, биохимические, биологические, антигенные, вирулентные, патогенные, генетические. На основании изучения биологических свойств культуру идентифицировали до рода, вида, серотипа (серовара).

Важным разделом коллекционной работы по изучению свежевыделенных культур является определение их чувствительности к антибиотикам. Во всех случаях определяли чувствительность культур к антибиотикам пенициллинового ряда (пенициллин, ампициллин, амоксициллин), аминогликозидам (стрептомицин, гентамицин, амикацин, нетромицин), цефалоспорином (цефаклор, цефтриаксон), фторхинолонам (ципрофлоксацин), а также к доксициклину, левомицетину и рифампицину.

Для ориентировочного определения чувствительности бактерий к антибиотикам использовали коммерческие специальные диски, содержащие соответствующие антибиотики. Значительно более точные результаты давал метод серийных разведений в жидкой и плотной питательных средах. Современным и более точным методом является определение чувствительности микроба к антибиотикам с помощью E-теста. E-тест представляет собой совокупность существующих основ

методов разведения и рассеивания. Также как, и обычные стандартные методы, Е - тест определяет значение МИК антибиотиков.

Определение чувствительности микроорганизма с помощью Е-теста проводили аналогично тестированию диско-диффузионным методом, когда вместо диска с антибиотиком использовали полоску Е-теста, содержащую градиент концентраций антибиотика от максимальной к минимальной.

Одним из важных биологических характеристик эпизоотических культур является патогенность, к которой относятся токсигенность, токсичность и вирулентность. Изучение патогенности свежeweделенных культур проводили на лабораторных животных (белые мыши, морские свинки, кролики).

Эти исследования являются одной из главных задач коллекционной работы, от результатов которых, в целом, может зависеть объем противоэпизоотических мероприятий. Для испытания культуры на токсигенность, т.е. на образование токсина, ее выращивали на бульоне длительное время (2-3 недели). Бульонную культуру фильтровали через фильтры Зейтца и фильтрат испытывали на животных подкожной или внутритрожной пробой.

Токсичность микроорганизмов связана с наличием в бактериальной клетке компонентов, ядовитых для организма животных. С целью исключения взаимодействия с вирулентностью, для определения токсичности использовали инактивированную взвесь культуры, которую вводили белым мышам. Так как, бульон сам по себе может быть токсичным или может содержать продукты метаболизма, токсичность испытывали путем введения суточных культур, смытых с агара. Смыв суточного роста на агаре, доведенный до желаемого стандарта разведением, помещали в водяную баню при 60-70 °С, после чего вводили мышам внутривентриально 500 млн - 1,0 - 1,5 - 2,0 млрд. м.к. Учет вели по гибели опытных животных. За токсическую дозу принимали ту дозу, от которой в течение 24-48 часов погибли все мыши, получившие эту дозу.

Вирулентностью микроорганизмов считают их способность размножаться в организме и вызывать быструю гибель животного. Тестирование смертельной дозы проводили, как правило, на белых мышах или морских свинках. Культуру вводили внутривентриально или внутривенно. Для сравнимых результатов использовали животных одного возраста и веса. Рекомендуется использовать белых мышей весом 16-18 г, морских свинок весом 300-350 г. Для опыта готовили взвесь бактерий агаровых молодых культур (18-20 часов культивирования), которую разводили физиологическим раствором до необходимой концентрации по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Тарасевича.

При определении токсичности и вирулентности использовали некоторые условные обозначения смертельных доз микробов: D<sub>1m</sub> (Dosis letalis minima) - наименьшая доза, которая убивает большинство животных, получивших ее; D<sub>cl</sub> (Dosis certe letalis)- наименьшая безусловно смертельная доза для всех животных, взятых для испытания ее; D<sub>I<sub>50</sub></sub> (или LD<sub>50</sub>) -доза, которая вызывает гибель 50% подопытных животных. Полученные сведения вносили в паспорт микроорганизма.

При поступлении выделенных культур в музей института сотрудники лаборатории проводили подробные изучения основных свойств возбудителя согласно паспортным данным. В дальнейшем часть штаммов из музея института передавали на хранение в республиканскую коллекцию микроорганизмов для сохранения и пополнения генофонда РК.

Возбудители инфекционных заболеваний, изолированные в эпизоотических очагах, уникальны, и в случае их утраты восстановление их посредством повторного выделения из природных популяций сопряжено с большими трудностями, финансовыми и трудовыми затратами. Поэтому программа последовательных действий по изучению и сохранению собранного генофонда (материала) в музее института включает различные направления работы – от адекватного изучения поступивших культур и их систематического отбора для хранения, до последующего углубленного исследования, классификации, таксономического описания, оценки научной значимости, разработки новых и совершенствования существующих методов долгосрочного хранения ценных культур.

Выделенные культуры после пересевов хранятся в пробирках на полужидком агаре (ПЖА), укупоренных парафинированными резиновыми пробками, и лиофилизированном состоянии с подготовленными паспортами и картами хранения штаммов микроорганизмов.

Для обеспечения наименьшего количества пересевов свежeweделенных культур при изучении их свойств в лаборатории музея института используется культура одной пробирки, остальные передаются без дополнительных пересевов.

Поступившие на исследование и хранение культуры в первую очередь изучали по всем признакам, начиная с культурально-морфологической характеристики, заканчивая изучением вирулентности классическими способами. На втором этапе изучения подключали молекулярные методы исследования, позволяющие провести их более точную и полную идентификацию, что использовали при составлении паспортов культур, создании каталога микроорганизмов, банка данных, содержащего информацию о геноме возбудителей, циркулировавших в природных очагах Казахстана при разной интенсивности эпизоотического процесса.

Внедрение разработанных новых методов выделения, идентификации и сохранения генофонда микроорганизмов различной видовой принадлежности способствует длительности поддержания стабильности их генетической информации.

Основная цель работы коллекции культур микроорганизмов в обеспечении непрерывности в передаче пользователям культур, штаммов и полезной научной информации о них, что, собственно, и составляет смысл устойчивого существования данного музея в Казахском научно-исследовательском ветеринарном институте.

Коллекция культур микроорганизмов содержит также необходимую информацию по истории происхождения и свойств сохраняемых штаммов. Наличие таких данных способствует повышению эффективности биотехнологических исследований, что снижает затраты организации промышленного производства.

Лаборатория эпизоотологии и генофонда микроорганизмов располагает подготовленным персоналом, имеющим навыки работы с возбудителями зоонозных инфекций, а также практику профессионального хранения/консервации коллекционных культур. Вместе с тем, основным аспектом коллекционной работы с возбудителями инфекционных заболеваний являются вопросы обеспечения биобезопасности, сопряженные с особой значимостью коллекций возбудителей зоонозных и зооантропонозных инфекций, в том числе и особо опасных.

Отдельным аспектом музейно-коллекционной работы является обеспечение биобезопасности коллекций, сопряженной с особой опасностью возбудителей инфекций. В настоящее время актуальными для Казахстана остаются проблемы обеспечения биологической безопасности, предписывающее создание комплекса мер по обеспечению биологической безопасности, в том числе строгий учет, контроль и обращение штаммов микроорганизмов-возбудителей опасных и особо опасных инфекций.

В институте хранится и поддерживается коллекция (генофонд) микроорганизмов (бактерий, вирусов, патогенных грибов, простейших), вызывающих заболевания человека, животных, в том числе и особо опасные, входит в перечень стратегических объектов республики. Источником повышенной опасности являются патогены I и II групп. Возбудители оспы, ящура, чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, туберкулеза вызывают особо опасные инфекционные заболевания. Потенциально они могут быть использованы в качестве компонентов биологического оружия или в террористических актах. Повышение биологической безопасности путем разработки технических и биологических моделей защиты и безопасности хранения микроорганизмов, патогенных для животных, является актуальной задачей [8,9]. Разработка, использование моделей защиты и безопасности хранения микроорганизмов позволит полностью предотвратить угрозу распространения патогенных агентов бактериального и вирусного происхождения за пределы института. Биологические патогенные агенты (ПБА) распределены по степени патогенности по группам [10].

В коллекции института хранятся представители I группы патогенности - вирус ящура типов А, О, Азия-1, вирус болезни Ньюкасла, вирусы оспы овец и коз; II группы патогенности – вирус чумы плотоядных, болезни Гамборо, бруцеллы; многочисленные представители II- IV группы патогенности: сальмонеллы, эшерихии, клостридии, пастереллы, листерии, микобактерии, кампилобактеры, стрептококки, стафилококки, патогенные грибы, простейшие. Разработка технических моделей защиты и безопасности хранения микроорганизмов позволяет предотвратить угрозу распространения патогенных агентов бактериального и вирусного происхождения за пределы института. Имеется ограждение территории института в соответствии

с современными требованиями двухуровневой физической защиты, предусмотренных для учреждений, деятельность которых связана с хранением возбудителей особо опасных инфекций.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Кудрявцев В.И. Каталог культур микроорганизмов, поддерживаемых в учреждениях.– Наука. – Москва, 1981.– 245 с.
- 2 Калакуцкий Л.В. Каталог культур микроорганизмов. М: Наука, 1992. - 190с.
3. Тулемисова К.А. Каталог культур микроорганизмов. Каталог. Астана, 2003.– 186 с.
4. Дьяконов Л. П. и др. Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных РККК(П), (СХЖ РАСХН). Каталог (2-е издание дополненное и уточненное). М., 2006.-114 с.
5. *Холт, Д и др.* Определитель бактерий Берджи. Каталог. М.: Мир, 1997, 1 том.. С. 192 -193.
6. Определитель Bergey's Manual of Systematic Bacteriology /Department of Microbiology and Molecular Genetics: Michigan State University: USA, 2005, Volum 2. Part B. p. 764 – 799.
- 7 Калина Г. П. Изменчивость патогенных микроорганизмов. Киев: Государственное медицинское изд-во УССР 1949. – С. 55- 57.
- 8 Абдыкалыков М. Биобезопасность в Казахстане: проблемы и перспективы / Ж. Пищевая и перерабатывающая промышленность Казахстана, 2007, №6.-С. 38-39.
- 9 Жантуриев М. К., . Жантуриев Б. М. Биотерроризм: профилактика и меры борьбы/ Мат III Межд. конф. «Состояние и перспективы развития производства ветеринарных биопрепаратов»/Алматы, 2006. –С. 76-87.
- 10 Сансызбай, А. Р. и др. Каталог культур микроорганизмов. Алматы, 2005.– 264 с.

#### LITERATURA

- 1 Kudrjavcev V.I. Katalog kul'tur mikroorganizmov, podderzhivaemyh v uchrezhdenijah.– Nauka. – Moskva, 1981.– 245 s.
- 2 Kalakuckij L.V. Katalog kul'tur mikroorganizmov. M: Nauka, 1992. - 190s.
3. Tulemisova K.A. Katalog kul'tur mikroorganizmov. Katalog. Astana, 2003.– 186 s.
- 4 D'jakonov L. P. i dr. Specializirovannaja kollekcija perevivaemyh somaticheskikh kletocnyh kul'tur sel'skohozjajstvennyh i promyslovyh zhivotnyh RKKK(P), (SHZh RASHN). Katalog (2-e izdanie dopolnennoe i utochnennoe). M., 2006.-114 s.
5. *Hoult, D i dr.* Opredelitel' bakterij Berdzhii. Katalog. M.: Mir, 1997, 1 tom.. S. 192 -193.
6. Opredelitel' Bergey's Manual of Systematic Bacteriology /Department of Microbiology and Molecular Genetics: Michigan State University: USA, 2005, Volum 2. Part V. p. 764 – 799.
- 7 Kalina G. P. Izmenchivost' patogennyh mikroorganizmov. Kiev: Gosudarstvennoe medicinskoe izd-vo USSR 1949. – S. 55-57.
- 8 Abdykalykov M. Biobezopasnost' v Kazahstane: problemy i perspektivy / Zh. Piwevaja i pererabatyvajuwaja promyshlennost' Kazahstana, 2007, №6.-S. 38-39.
- 9 Zhanturiev M. K., . Zhanturiev B. M. Bioterrorizm: profilaktika i mery bor'by/ Mat III Mezhd. konf. «Sostojanie i perspektivy razvitija proizvodstva veterinarnyh biopreparatov»/Almaty, 2006. –S. 76-87.
- 10 Sansyzbaj, A. R. i dr. Katalog kul'tur mikroorganizmov. Almaty, 2005.– 264 s.

Мусаева А.К., Егорова Н.Н.

«Коллекция культур микроорганизмов ТОО «Казахский научно - исследовательский ветеринарный институт»  
ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт», г. Алматы

Мусаева А.К.- доктор биологических наук. Заведующая лабораторией эпизоотологии и генофонда микроорганизмов ТОО «КазНИВИ». г. Алматы, 11 микрo- район, д. 38, кв. 64.

Егорова Н. Н.- кандидат ветеринарных наук. Старший научный сотрудник лаборатории эпизоотологии и генофонда микроорганизмов ТОО «КазНИВИ». г. Алматы, микрoрайон Самал-2, д. 53, кв. 5.