

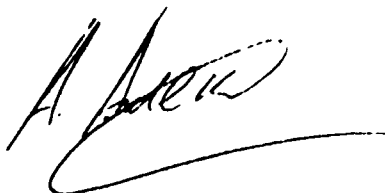
На правах рукописи

АЛЕКСЕЕВ АЛЕКСАНДР ЮРЬЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ПАТОГЕННЫХ МИКОБАКТЕРИЙ НА
ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией
и иммунология
03.00.23 – биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Новосибирск – 2004

Работа, выполнена в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор», Государственном научном учреждении Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН

Научные руководители: кандидат биологических наук
ШЕСТОПАЛОВ Александр Михайлович,
кандидат биологических наук
РЕПИН Владимир Евгеньевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
АЛИКИН Юрий Серафимович,
доктор ветеринарных наук, профессор
ЛУНИЦЫН Василий Герасимович

Ведущая организация: Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных СО РАСХН
(г. Омск)

Защита состоится « 6 » апреля 2004 г. в 10 ч. на заседании диссертационного совета Д.006.045.01 в ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН по адресу: 630501, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, п. Краснообск, СО РАСХН, ГНУ ИЭВСидВ

*С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО РАСХН

Автореферат разослан « 2 » марта 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Логинов С.И.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

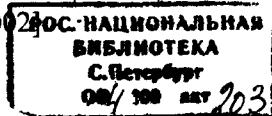
Актуальность проблемы. Туберкулез – заболевание человека и животных, представляющее одну из первостепенных проблем здравоохранения и приводящее к большим потерям среди поголовья сельскохозяйственных животных [Донченко А.С., 1998]. По данным ВОЗ, от туберкулеза ежегодно умирает около 3 млн. людей (каждые 10 секунд от туберкулеза умирает 1 человек) [Global tuberculosis control // World Health Organization report, 2003]. Среди инфекционных заболеваний животных удельный вес туберкулеза составляет более 30% [Шаров А.Н., 1989].

В России основным этиологическим фактором туберкулеза являются микобактерии, относящиеся к *Mycobacterium tuberculosis complex*. Помимо микобактерий данной группы иногда заболевание туберкулезом у животных и людей вызывается видом *Mycobacterium avium* [Романенко В.Ф. и др., 2002].

Основы бактериологической диагностики туберкулеза разработаны еще в 30-50 годы XX века и с тех пор они не претерпели существенных изменений. В настоящее время для культивирования микобактерий используют плотные и жидкие питательные среды, имеющие свои достоинства и недостатки.

Нужно отметить, что современные методы долгого поддержания коллекционных штаммов в живом, биологически неизменном культивируемом состоянии являются неэффективными, так как накоплено достаточно данных об изменении их свойств в процессе длительного культивирования (даже через 2-3 пассажа) на общепринятых питательных средах [Caldwell D.E. et al., 1997; Ramirez E., Villaverde A., 1997; Олескин А.В. и др., 2000; Головлев Е.Л., 2001].

Общепризнанно, что длительное культивирование патогенных микобактерий на стандартных питательных средах приводит к снижению вирулентности [Кузьев В.А. 1972; Благодарный Я.А., Блехман И.М., 1976; Голышевская В.И., 1995; Пушкарева В.И., Боев Б.В., 1997; Романенко В.Ф. и др., 2002; Вишневский Б.И. и др., 2002]. Несмотря на то, что для длительного культивирования рекомендовано большое количество питательных сред и способов культивирования, ни один из них не позволяет сохранять биологические свойства *Mycobacterium tuberculosis complex* неизменными [Донченко А.С., Донченко В.Н., 1994; Романенко В.Ф. и др., 2002; Вишневский Б.И. и др., 2002].



В связи с вышеизложенным, разработка метода, позволяющего сохранять биологические свойства *Mycobacterium tuberculosis complex* неизменными в процессе длительного культивирования, является актуальной проблемой биологической науки.

Цель и задачи исследований. Целью работы явилась разработка метода длительного культивирования патогенных микобактерий на основе перевиваемой культуры клеток и изучение сохранения биологических свойств микобактерий при его применении.

Для достижения основной цели решались следующие задачи:

1. Изучить возможность использования метода культивирования на основе перевиваемой культуры клеток для длительного культивирования *Mycobacterium tuberculosis*.
2. Изучить морфологические и культуральные характеристики *Mycobacterium tuberculosis complex* при замене ростовых сред и линий перевиваемых культур клеток.
3. Изучить сохранность вирулентных свойств и лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* при длительном культивировании на перевиваемой культуре клеток
4. Изучить чувствительность метода культивирования на культуре клеток к внесенной дозе инфицирующего агента – микобактерии туберкулеза.
5. Определить локализацию *Mycobacterium tuberculosis* во время роста на перевиваемой культуре клеток.

Научная новизна работы. Впервые для приближения условий культивирования *Mycobacterium tuberculosis complex* к естественным условиям в качестве компонента в среде использована перевиваемая культура клеток.

Впервые достигнуто сохранение биологических свойств (морфологических, культуральных, вирулентных) *Mycobacterium tuberculosis complex* в процессе длительного культивирования при совместном культивировании микобактерий и перевиваемых культур клеток.

Впервые показано, что микобактерии туберкулеза не проникают в клетку во время роста на перевиваемой культуре клеток *Vero*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты проведенных исследований являются экспериментально-теоретической базой для решения проблемы сохранения биологических свойств выделенных и хранящихся штаммов патогенных микобактерий в изменяющихся условиях существования.

Разработан метод длительного культивирования микобактерий туберкулеза на перевиваемой культуре клеток, позволяющий сохранять биологические свойства микобактерий неизменными в процессе культивирования. На метод культивирования получен патент РФ “Метод культивирования микроорганизмов *Mycobacterium tuberculosis*” № 2209829, от 10.08.2003г.

Проведенные исследования позволяют использовать разработанный метод для сохранения биологических свойств патогенных микобактерий разных видов (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*) неизменными в процессе длительного культивирования.

Разработаны методические рекомендации “Метод длительного культивирования микобактерий туберкулезного комплекса на перевиваемой культуре клеток”. Рекомендации утверждены Ученым советом ГНУ ИЭВСиДВ (протокол №7 от 30 сентября 2003 г.), и подсекцией “Инфекционные патологии животных в регионе Сибири и Дальнего Востока” ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол № 19 от 30 сентября 2003 г.)

Апробация работы. Полученные результаты были представлены в виде стендовых сообщений на:

- Congress of ECCO XIX (European Culture Collections' Organization), The Biological Ressource Centers and Genetics, May 11-12, 2000;
- 5-м Международном семинаре-презентации инновационных научно-технических проектов в области биотехнологии “Биотехнология – 2001”, Россия, Пушкино, 25-27 сентября, 2001 г.;
- Всероссийской научной конференции “Клинические перспективы в инфектологии”, посвященной 125-летию со дня рождения профессора Н.К. Розенберга и 105-летию кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии, Россия, Санкт-Петербург, 17-18 октября, 2001 г.;

- International Conference "Molecular Mechanisms of Genetical Processes and Biotechnology", Russia-Byelorussia, Moscow-Minsk, 18-24 november, 2001;
- Второй научной конференции с международным участием "Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера", Россия, Новосибирск, 29-31 мая 2002 г.;
- International Symposium "Integrative medicine" in International Congress "Progressive Scientific Technologies for Human Health", Ukraine, Kara-Dag, Feodosia (Crimea), June 8-19, 2003;
- II Международной научно-практической конференции "Актуальные вопросы зоотехнической науки и практики как основа улучшения продуктивных качеств и здоровья сельскохозяйственных животных", Россия, Ставрополь, 22-24 октября, 2003 г.;

Результаты были доложены на:

- IX International Conference "New Information Technology in Medicine and Ecology", Ukraine, Gursuf (Crimea), June 1-10, 2001;
- Конференции молодых ученых СО РАМН по проблемам фундаментальной и прикладной медицины, Россия, Новосибирск, 14-15 июня, 2001 г.;
- VIII Съезде Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Москва, 26-28 марта 2002 г.;
- Satellite Symposium "New Technologies in Medicine and Biology of the 3-rd Millennium" in I International Symposium "Stress and Extreme Conditions", Ukraine, Kara-Dag, Feodosia (Crimea), June 5-14, 2002;
- Межрегиональной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АМН СССР С.П. Карпова, Томск, Россия, 7-10 октября 2003 г.

Публикация результатов диссертации. По теме диссертации опубликовано 14 научных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 143 страницах и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических предложений, списка используемой литературы и приложения. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 30 рисунками.

Список использованной литературы включает 173 источника, в том числе 61 иностранных.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Разработан новый метод длительного культивирования микобактерий туберкулезного комплекса на перевиваемой культуре клеток, позволяющий сохранять морфологические, культуральные, вирулентные характеристики и лекарственную устойчивость микобактерий неизменными в процессе длительного культивирования.

- Метод культивирования на перевиваемой культуре клеток чувствительнее культивирования на жидких питательных средах в 10 – 100 раз.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Работа выполнялась с 1999 по 2003 год в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ГНЦ ВБ «Вектор») и в Государственном научном учреждении Институте экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (ГНУ ИЭВСиДВ).

В работе использовались выделенные автором и задепонированные в Институте коллекции культур микроорганизмов ГНЦ ВБ «Вектор» штаммы возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* B-891, *M. tuberculosis* B-892, *M. bovis* B-909, *M. avium* B-910. Перевиваемая линия культуры клеток Vero была получена из Института клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор». Перевиваемая линия культуры клеток ПЛ-91 [патент РФ 2121501] была любезно предоставлена владельцем Дурымановым А.Г.

Все питательные среды и лекарственные препараты, использованные в работе были коммерческого производства.

Мазки культур с жидких и плотных питательных сред фиксировали и окрашивали по методу Циля-Нильсена.

Для изучения сохранения вирулентности микобактерий проводили подкожное заражение здоровых морских свинок весом 250-300 г. в дозе 1 мл бактериальной взвеси 5 ЕД бак.стандарта мутности.

Для оценки распространения и характера туберкулезных поражений у морских свинок была использована модифицированная схема Ю.К. Вейсфелера [1975].

Для определения высеваемости микобактерий отбирались образцы из внутренних органов морских свинок, обрабатывались по ГОСТ 26072-89 и проводился высев на среду Левенштейна-Йенсена. На 30 сутки подсчитывались визуально видимые характерные колонии микобактерий туберкулеза.

Образцы для электронной микроскопии были залиты фиксатором (10% формалин) и переданы заведующему лабораторией патофизиологии и микроскопии Института молекулярной биологии ГНЦ ВБ «Вектор» Рябчиковой Е.И.

2.2. Результаты исследований

2.2.1. Изучение сохранения морфологических и культуральных свойств *Mycobacterium tuberculosis* при длительном культивировании на перевиваемой культуре клеток

В предварительных исследованиях были отработаны условия поддержания перевиваемой культуры клеток *Vero* в виде монослоя в течение 40-50 суток без смены ростовой среды. Авторским коллективом [Дурыманов А.Г., Рассадкин Ю.Н., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М., Репин В.Е.] было предложено использовать совместное культивирование микобактерий туберкулеза и перевиваемой культуры клеток в виде долгоживущего монослоя. Предполагалось, что использование данного подхода позволит сохранять биологические свойства микобактерий неизменными при длительном культивировании.

Для проверки данной гипотезы было проведено культивирование *M. tuberculosis* с использованием ростовой среды BSK-II и культуры клеток *Vero* в течении 5 пассажей. Сравнивались 2 штамма микобактерий туберкулеза (таблица 1). Несмотря на некоторые различия в характере роста штаммов, можно отметить, что при росте микобактерий туберкулеза в этой системе культивирования наблюдаются только нитчатые формы. Наблюдаемые конгломераты клеток скреплены этими нитчатыми формами и выглядят как друзды грибов.

Характерной особенностью культивирования *M. tuberculosis* предлагаемым методом является сохранение скорости роста клеток. При выращивании микобактерий традиционными методами

(культивирование на плотных и жидких питательных средах), наблюдается процесс их адаптации к питательной среде, что выражается в изменении морфологии клеток, увеличении скорости роста, либо остановкой роста. Одновременно происходит изменение биологических свойств штамма. В предлагаемой системе культивирования, при внесении одинаковых инфицирующих доз, максимальное накопление биомассы мы получали на 28 суток в каждом из 5 последовательных пассажей.

Таблица 1. Динамика роста *Mycobacterium tuberculosis* с использованием среды BSK-II и культуры клеток *Vero*

Сутки	Штамм №В-891	Штамм №В-892
7	На части клеток в монослой темные шероховатые пятна, идентифицирующиеся как нитчатые образования, связанные плотно с поверхностью этих клеток. 10 - 20 темных зон, размерами 30-50 клеток.	
14	Темные образования увеличились и стали выступать над поверхностью монослоя клеток, оставаясь прикрепленными к монослою.	
21	Смешанная картина: - темные образования шаровидной формы находятся в питательной среде во взвешенном состоянии; - формы, связанные с монослоем клеток; - отдельные темные образования.	Смешанная картина: - темные образования шаровидной, вытянутой, эллипсовидной и неправильной формы находятся в питательной среде во взвешенном состоянии; - формы, связанные с монослоем клеток; - отдельные темные образования.
28	40% монослоя клеток разрушено. Большое количество темных шаровидных образований размером 200-400 мкм взвешенно в среде. Края образований выглядят неровно.	100% разрушение монослоя клеток. Большое количество темных образований разных форм и размерами 100 - 800 мкм взвешенно в среде. Края образований выглядят неровно.

Картина развития процесса по контрольным точкам (7, 14, 21 и 28 сутки культивирования) совпадала в каждом пассаже с точностью до 1 суток. Клетки микобактерий туберкулеза сохраняли свои морфологические и культуральные характеристики в течение всех пассажей.

Таким образом, представленный метод позволяет сохранять морфологические и культуральные характеристики штамма неизменными при длительном культивировании.

2.2.2. Изучение морфологических и культуральных свойств микобактерий туберкулезного комплекса при культивировании на перевиваемой культуре клеток

Для определения роли ростовой среды и культуры клеток в разработанном методе культивирования *M. tuberculosis* была изучена возможность замены ростовой питательной среды и перевиваемой культуры клеток. Использовали ростовые питательные среды: среда Игла MEM-МД и среда BSK-II; а также перевиваемые культуры клеток *Vero* и ПК-91.

Оценивая результаты проведенного эксперимента можно сделать заключение, что в случае замены перевиваемой культуры клеток линии *Vero* на перевиваемую культуру клеток линии ПК-91 при использовании одинаковой ростовой среды (либо BSK-II, либо Игла MEM-МД) существенных различий в характере роста *M. tuberculosis* штамм В-891 не наблюдали (таблица 2). Кроме того, показано, что при замене ростовой среды BSK-II на ростовую среду Игла MEM-МД меняются только сроки роста *M. tuberculosis*, но морфология роста микобактерий остается неизменной.

Была оценена возможность использования метода для культивирования других патогенных микобактерий, вызывающих туберкулез. В работе использовались коллекционные штаммы трех видов микобактерий: *Mycobacterium tuberculosis* штамм В-891, *Mycobacterium bovis* штамм В-909, *Mycobacterium avium* штамм В-910.

Наблюдаемая динамика роста различных микобактериальных штаммов при культивировании на перевиваемой культуре клеток была сходной с динамикой *M. tuberculosis* штамм В-891, наблюдаемой на среде Игла MEM-МД с культурой клеток *Vero*, представленной в табл. 2.

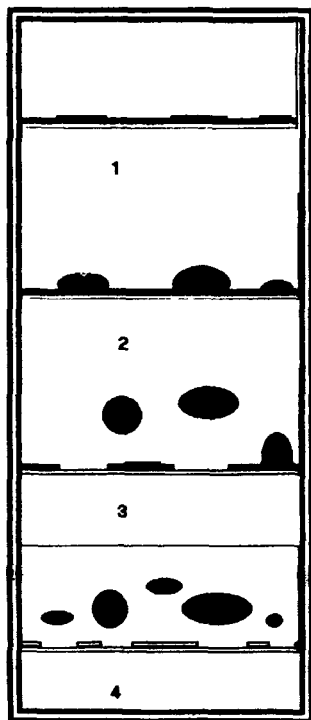
Таблица 2. Динамика роста *Mycobacterium tuberculosis* штамм В-891 с использованием среды BSK-II или Игла МЕМ-МД и культур клеток *Vero* и ПК-91

сутки	Культура клеток <i>Vero</i>	культура клеток ПК-91
7 (3)	На части клеток в монослое обнаруживаются темные шероховатые пятна, идентифицирующиеся как нитчатые образования, связанные плотно с поверхностью этих клеток. 10-30 темных зон, размерами 30-50 клеток.	
14 (5)	Темные образования увеличились, приобрели шаровидную форму и стали выступать над поверхностью монослоя клеток, оставаясь прикрепленными к монослою.	
21 (7)	Смешанная картина: - темные образования шаровидной и неправильной формы находятся в питательной среде во взвешенном состоянии; - мелкие и другие более крупные формы, связанные с монослоем клеток; - отдельные темные образования.	
28 (10)	40-100% разрушение монослоя клеток. Большое количество темных образований разных форм взвешенно в среде. Края образований выглядят неровно. Размеры образований 200-400 мкм (около 100 мкм).	

() – динамика роста с использованием среды Игла МЕМ-МД

При использовании предлагаемого метода культивирования наблюдается несколько фаз в процессе роста микобактерий туберкулезного комплекса, которые являются общими и не зависят от используемой ростовой среды и перевиваемой культуры клеток (рисунок 1).

Рисунок 1. Схема изменения фаз в процессе роста микобактерий туберкулезного комплекса на перевиваемой культуре клеток



1. Обязательно присутствует фаза прикрепления микобактерий туберкулеза к клеткам монослоя.

2. Второй фазой является фаза роста микобактерий на клеточном субстрате с видимым увеличением биомассы.

3. Третья фаза – смешанная, когда присутствуют элементы, растущие на субстрате и во взвешенном состоянии.

4. Четвертая фаза – частичное или полное разрушение монослоя и продолжение роста во взвешенном состоянии.

При использовании разных ростовых сред, разных линий перевиваемых культур клеток и разных видов микобактерий туберкулезного комплекса наблюдается только изменение сроков роста и размеров конгломератов, но количество и порядок перечисленных фаз остается неизменным.

2.2.3. Изучение сохранения вирулентности и лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза при длительном культивировании на перевиваемой культуре клеток

Было изучено сохранение вирулентности патогенных микобактерий (на примере *M. tuberculosis* штамм В-891) в процессе длительного (13 пассажей) культивирования на среде с культурой клеток *Vero*. Для сравнения проводилось культивирование того же штамма микобактерий туберкулеза на рекомендуемой ВОЗ питательной среде Левенштейна-Йенсена.

Изменение вирулентности оценивали по изменению степени пораженности внутренних органов морских свинок, зараженных выращенными на выбранных питательных средах микобактериями с каждого пассажа.

Таблица 3. Оценка патологических изменений внутренних органов морских свинок, зараженных микобактериями туберкулеза, выращенными на разных средах, *среднее по группе* (по Ю.К. Вейсфейлеру, 1975)

Органы	Среда Левенштейна-Йенсена					
	пассажи					
	1	2	3	4	5	
Легкие	4	1	1	0	0	
Печень	4	2	1	1	0	
Селезенка	4	3	3	4	0	
Паховые л/у	4	3	3	1	0	
Органы	Среда Игла MEM-МД с культурой клеток <i>Vero</i>					
	пассажи					
	1	2	3	5	7	13
Легкие	2	4	3	3	3	3
Печень	4	3	4	4	4	3
Селезенка	4	4	4	4	4	4
Паховые л/у	3	3	3	2	3	3

4, 3, 2, 1 - наличие видимых, макроскопических, характерных при туберкулезе патологических изменений органа на + + + +, + + +, + +, + (соответственно);

0 - отсутствие характерных при туберкулезе патологических изменений органа.

При оценке наличия патологических изменений внутренних органов морских свинок, зараженных микобактериями, выращенными на среде Левенштейна-Йенсена (таблица 3), наблюдалась постепенная элиминация патологических изменений, до полного их исчезновения – 5 пассаж.

Напротив, при оценке внутренних органов морских свинок, зараженных микобактериями, выращенными на среде с культурой

клеток *Vero* наблюдалось сохранение патологических изменений до 13 пассажа (срок наблюдения).

Кроме этого оценивалась бактериальная обсемененность внутренних органов опытных морских свинок.

Полученные результаты (таблица 4) показали постепенное снижение количества колоний микобактерий из органов морских свинок, зараженных *M. tuberculosis* штамм В-891, выращенный на среде Левенштейна-Йенсена.

Обсемененность внутренних органов морских свинок, зараженных *M. tuberculosis* штамм В-891, выращенном на среде Игла МЕМ-МД-*Vero* более высока и не снижается от пересева к пересеву. Наблюдалась стабильно высокая высеваемость микобактерий (50 и выше колоний), более чем в 90% случаях.

Таблица 4. Высеваемость микобактерий из органов морских свинок, зараженных *Mycobacterium tuberculosis* штамм В-891, выращенным на разных средах, количество колоний, среднее

Органы	Среда Левенштейна-Йенсена					
	пассажи					
	1	2	3	4	5	
Легкие	50-100	20-25	2-3	0	0	
Печень	>100	18-27	11-26	12-30	0	
Селезенка	>100	50-100	50-100	>100	0	
Паховые л/у	>100	50-100	50-100	6-22	0	
Органы	Среда Игла MEM-МД с культурой клеток <i>Vero</i>					
	пассажи					
	1	2	3	5	7	13
Легкие	37-64	>100	50-100	32-94	50-100	50-100
Печень	>100	50-100	>100	>100	>100	50-100
Селезенка	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Паховые л/у	50-100	50-100	50-100	23-48	50-100	50-100

Таким образом, при культивировании микобактерий туберкулезного комплекса с помощью стандартного метода – на среде Левенштейна-Йенсена, вирулентность микобактерий уменьшалась. При заражении лабораторных животных микобактериями выращенными на перевиваемой культуре клеток

наблюдалась полная обсемененность исследуемых органов в отличие от выращенных на среде Левенштейна-Йенсена.

Так как изменения лекарственной чувствительности микобактериальных штаммов имеют важное значение, была изучена степень изменения лекарственной чувствительности выбранного штамма после длительного культивирования на перевиваемой культуре клеток -18 пассажей. Штамм изначально на втором пассаже после выделения из биоматериала был устойчивый к рифампицину и стрептомицину и чувствительный к канамицину, изониазиду, пипразинамиду, этамбутолу в рекомендованных концентрациях.

Биомасса микобактерий 18 пассажа на среде с культурой клеток была собрана, освобождена от старой среды промыванием физиологическим раствором, разведена и мерно высеяна на среды Игла MEM-МД с культурой клеток *Vero* с противотуберкулезными препаратами. Для контроля и оценки роста также был проведен в той же дозе посев на среды Сотона и Школьниковой.

Оценка характера роста *M. tuberculosis* в течение 10 дней показала на средах с изониазидом, пипразинамидом, этамбутолом и канамицином только прикрепление внесенных микобактерий. Динамики в росте не обнаруживалось. На средах с рифампицином и стрептомицином наблюдался рост и накопление биомассы.

Таким образом, лекарственная устойчивость штамма при длительном культивировании его на среде Игла MEM-МД-*Vero* не изменилась.

2.2.4. Изучение характеристик роста микобактерий туберкулеза на различных питательных средах

Было проведено сравнение различных способов культивирования *M. tuberculosis* В-891 и выяснение зависимости сроков роста от количества внесенной инфицирующей дозы. На среды проводился посев исходным раствором культуры микобактерий в физиологическом растворе и стократными разведениями исходного раствора: 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} .

При оценке динамики роста (таблица 5), можно увидеть, что на твердой среде Финн-2, начало роста при исходной дозе посева наблюдали на 21 сутки культивирования. В дальнейшем было получено 2-3 выросших колонии.

На среде Игла МЕМ-МД-*Vero* было отмечено начало роста при исходной, 10^{-2} , 10^{-4} дозах посева на 7 сутки культивирования. Далее происходило бурное накопление биомассы до 21 дня культивирования и в дальнейшем замедление роста микобактерий туберкулеза.

Таблица 5. Динамика роста микобактерий туберкулеза на изученных средах

Сут-ки	Разведения	Финн-2	Сотона	Школьный-кой	Игла МЕМ-МД с <i>Vero</i>	Игла МЕМ-МД	Игла МЕМ-МД с лизатом <i>Vero</i>
7	Исходное	-	-	-	+	-	-
	10^{-2}	-	-	-	+	-	-
	10^{-4}	-	-	-	+	-	-
	10^{-6}	-	-	-	-	-	-
14	Исходное	-	+	+	++	+	+
	10^{-2}	-	-	+	++	+	+
	10^{-4}	-	-	-	++	+	+
	10^{-6}	-	-	-	+	-	-
21	Исходное	+	++	++	+++	+	+
	10^{-2}	-	+	+	++	+	+
	10^{-4}	-	-	-	++	+	+
	10^{-6}	-	-	-	+	-	-
29	Исходное	+	++	++	+++	+	+
	10^{-2}	-	+	+	++	+	+
	10^{-4}	-	-	-	++	+	+
	10^{-6}	-	-	-	+	-	-

-- отсутствие роста;

+ - начало роста;

++ - средний рост;

+++ - быстрое накопление биомассы.

Важно отметить, что при 10^{-6} дозе посева видимый рост *M. tuberculosis* штамм В-891 был обнаружен только на среде Игла МЕМ-МД-*Vero* (на 14 день культивирования). Это говорит о том, что в разведении 10^{-6} присутствовали единичные клетки

микобактерий, для заметного роста которых необходимо было длительное время и благоприятные условия.

Таким образом, экспериментальная среда с монослоем перевиваемой культуры клеток являлась более чувствительной среди изученных сред к внесенной дозе инфицирующего агента – микобактерии туберкулеза. Большее количество клеток или мелких конгломератов клеток микобактерий туберкулеза проявляло свой рост в данной системе культивирования. Быстрее всего наблюдался рост микобактерий туберкулеза на среде с культурой клеток *Vero*.

Для определения количества КОЕ с 2-х сред (Сотона и Игла МЕМ-МД с культурой клеток *Vero*) был проведен высеv суспензии растущих микобактерий одного возраста и одинаковым объемом на плотную питательную среду Левенштейна-Йенсена.

Из полученных результатов (таблица 6) видно, что в среде Сотона отмечено присутствие чрезвычайно низкого количества КОЕ, в сравнении со средой Игла МЕМ-МД-*Vero*. Разница исчисляется 1-2 порядками, т.е. в 10-100 раз. Также необходимо отметить, что в изученных жидких средах кроме небольшого количества конгломератов средних размеров, которые более быстро проявились в виде видимых колоний на плотной среде, присутствовало значительное количество более мелких скоплений микобактерий, которые проявились в виде видимых колоний на плотной среде через длительных промежутков времени (до 4 недель).

Таблица 6. Количество видимых колоний *Mycobacterium tuberculosis* штамм В-891 на плотной среде Левенштейна-Йенсена, среднее

посев со среды	14 суток культивирования	28 суток культивирования
Сотона	0,2±0,13	8,7±1,16
Игла МЕМ-МД с культурой клеток <i>Vero</i>	16,6±4,32	136±11,2

P<0,001

2.2.5. Изучение локализации *Mycobacterium tuberculosis* штамм В-891 во время роста на культуре клеток *Vero*

Была изучена пространственная локализация *Mycobacterium tuberculosis* при культивировании его совместно с живой системой

– перевиваемой культурой клеток *Vero*. Для этого, монослой клеток, освобожденный от микобактерий, не прикрепившихся или не проникших в клетки *Vero*, был собран и передан для электронной микроскопии. Дополнительно, для электронной микроскопии была подготовлена суспензия растущих *Mycobacterium tuberculosis* штамм В-891 на среде Игла MEM-МД-*Vero* на 10 сутки культивирования. Монослой был уже разрушен, и все конгломераты находились в толще среды.

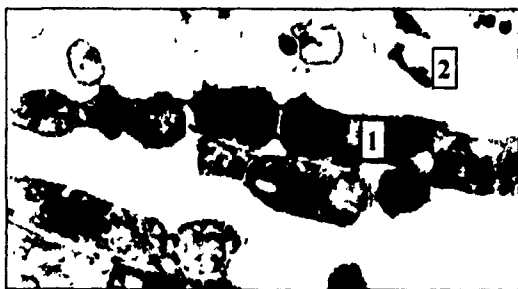


Рис. 2. Среда Игла MEM-МД-*Vero*. 3 сутки культивирования.

1- клетка *Mycobacterium tuberculosis* штамм В-891;

2- клетка *Vero*

(x 42000).

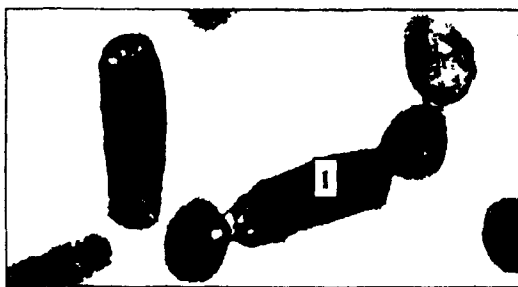


Рис. 3. Среда Игла MEM-МД-*Vero*. 10 сутки культивирования .

1- клетка *Mycobacterium tuberculosis* штамм В-891 (x 52000).

Результат, представленный на рисунках 2 и 3, показал, что *Mycobacterium tuberculosis* не проникают в клетки *Vero*, а прикрепляются к их поверхности.

В дальнейшем происходит размножение микобактерий и их рост на поверхности перевиваемой культуры клеток – 1-я фаза роста.

В толще среды наблюдаются конгломераты микобактерий с живыми и мертвыми клетками *Vero* – 4-я фаза роста. По-видимому, когда при размножении микобактерии покрывают собой всю поверхность клетки *Vero* в монослое, то она теряет свои функциональные свойства из-за изменения питательного баланса, открепляется от монослоя, но остается живой (2-я, 3-я фаза роста). В дальнейшем, присутствуя в конгломерате в живом виде, она стареет и постепенно отмирает. При этом процессе рост микобактерий туберкулеза сохраняется.

3. ВЫВОДЫ

1. Впервые разработан уникальный метод длительного культивирования микобактерий туберкулезного комплекса на перевиваемой культуре клеток, позволяющий сохранять их морфологические, культуральные, вирулентные характеристики и лекарственную устойчивость неизменными в процессе длительного культивирования.

2. Установлено, что при использовании предлагаемого метода культивирования наблюдается четыре фазы в процессе роста туберкулезных микобактерий (*M. tuberculosis* штамм В-891, *M. tuberculosis* штамм В-892, *M. bovis* штамм В-909, *M. avium* штамм В-910), которые являются общими, и не зависят от используемой ростовой среды (BSK-II или Игла МЕМ-МД) и перевиваемой культуры клеток (*Vero* или ПК-91).

3. Выявлено, что патологическая картина и бактериальная обсемененность внутренних органов у животных, зараженных микобактериями, культивируемыми на перевиваемой культуре клеток и микобактериями, выросшими на стандартной среде Левенштейна-Йенсена существенно отличается.

4. Разработанный метод культивирования на перевиваемой культуре клеток чувствительнее к внесенной дозе инфицирующего агента – микобактерии туберкулеза, чем метод культивирования на жидких питательных средах (Сотона, Школьниковой, Игла МЕМ-МД, Игла МЕМ-МД с лизатом *Vero*) в 10-100 раз.

5. Показано, что *Mycobacterium tuberculosis* штамм В-891 при культивировании разработанным методом не проникает в клетки перевиваемой культуры (*Vero*), а прикрепляется к их поверхности.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

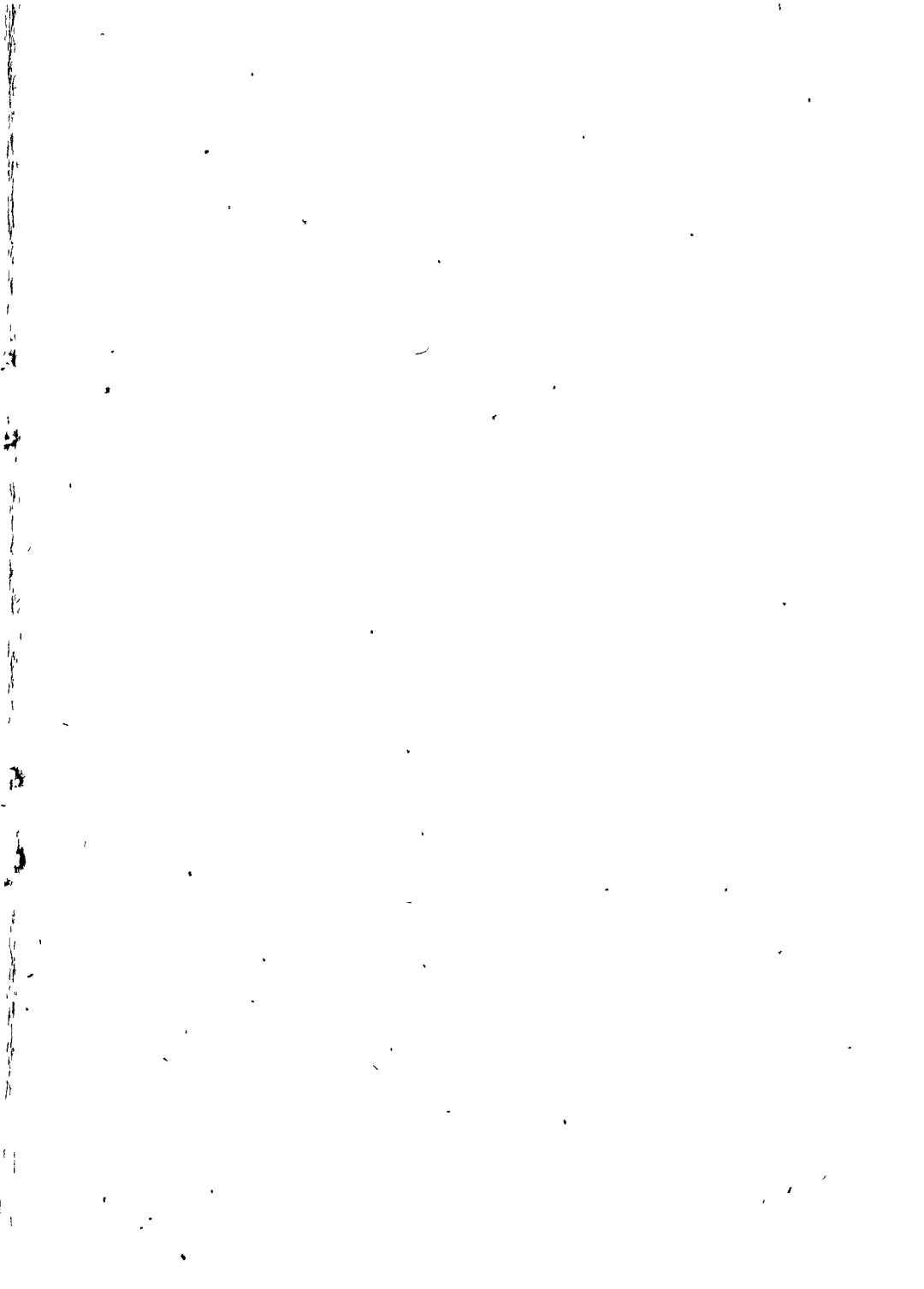
Разработан метод длительного культивирования микобактерий туберкулезного комплекса на перевиваемой культуре клеток. Материалы диссертации использованы при разработке методических рекомендаций "Метод длительного культивирования микобактерий туберкулезного комплекса на перевиваемой культуре клеток". Рекомендации утверждены Ученым советом ГНУ ИЭВСиДВ (протокол №7 от 30 сентября 2003 г.), и подсекцией "Инфекционные патологии животных в регионе Сибири и Дальнего Востока" ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол № 19 от 30 сентября 2003 г.).

5. СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Problem of tuberculosis in Siberia, Russia / Co-author: V.E. Repin, A.P. Duntau, V.V. Bakaev et al. // Congress of ECCO XIX (European Culture Collections' Organization): Proceedings - The Biological Ressource Centers and Genetics. 2000. – P. 130.
2. Метод культивирования микобактерий туберкулеза на основе культуры клеток / Соавт.: А.М. Шестопалов, Ю.Н. Рассадкин, А.Г. Дурыманов и др. // Клинические перспективы в инфектологии: Всерос. науч. конф., посвящ. 125-летию со дня рождения проф. Н.К. Розенберга и 105-летию каф. инфекцион. болезней Воен.-мед. академии: Матер. конф. - Россия, Санкт-Петербург, 2001. – С. 220.
3. Новые возможности в культивировании микобактерий туберкулеза / Соавт.: А.Г. Дурыманов, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопалов и др. // Биотехнология – 2001: 5-й Международный семинар-презентация инновационных научно-технических проектов в области биотехнологии: Материалы – Пушкино, 2001. – С. 207-208.
4. Новый подход к культивированию микобактерий туберкулеза // Конференция молодых ученых СО РАМН по проблемам фундаментальной и прикладной медицины: Сб. тез. - Новосибирск, 2001. - С. 4-5.
5. A New Method for *Mycobacterium tuberculosis* Cultivation / Co-author: A.G. Durimanov, Yu.N. Rassadkin, N.A. Donchenko et al. // IX International Conference "New Information Technology in Medicine and Ecology": Proceedings - Ukraine, Gursuf (Crimea), 2001. - P. 158-160.

6. Method for *Mycobacterium tuberculosis* Cultivation on a Continuous Cell Culture Basis / Co-author: A.G. Durimanov, Yu.N. Rassadkin, A.M. Shestopalov // International Conference "Molecular Mechanisms of Genetical Processes and Biotechnology": Proceedings - Russia-Byelorussia, Moscow-Minsk, 2001. - P. 325-326.
7. Использование нового метода культивирования для изучения свойств микобактерий туберкулеза / Соавт.: А.Г. Дурыманов, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопалов // Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера: Вторая научная конференция с международным участием: Тез. докл. - Новосибирск, 2002. - С. 178.
8. Метод культивирования для изучения физиологии микобактерий / Соавт.: А.Г. Дурыманов, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопалов и др. // Материалы VIII Съезда Всеросс. общества эпидемиологов, микробиол. и паразитологов: Сб. статей в 4 томах, т.3. - Москва, 2002. - С. 186-187.
9. Influencing of Infection Mediums Conditions on *Mycobacterium tuberculosis* Cultivation / Co-author: A.G. Durimanov, Yu.N. Rassadkin, A.M. Shestopalov // Satellite Symposium "New Technologies in Medicine and Biology of the 3-rd Millennium" in I International Symposium "Stress and Extreme Conditions": Proceeding - Ukraine, Kara-Dag, Feodosia (Crimea), 2002. - P. 95.
10. Изучение чувствительности методов культивирования *Mycobacterium bovis* / Соавт.: А.Г. Дурыманов, А.М. Шестопалов, П.В. Бушмелева и др. // Актуальные вопросы зоотехнической науки и практики как основа улучшения продуктивных качеств и здоровья сельскохозяйственных животных: Материалы II Международной научно-практической конференции. - Ставрополь, 2003. - С. 252-253.
11. Метод культивирования микроорганизмов *Mycobacterium tuberculosis* / Соавт.: А.Г. Дурыманов, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопалов и др. // Патент РФ №2209829, БИ 22, 10.08.2003.
12. Определение лекарственной устойчивости штаммов микобактерий туберкулеза с помощью нового метода культивирования / Соавт.: А.Г. Дурыманов, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопалов // Межрегиональная научная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика АМН СССР С.П. Карпова: Тез. докл. - Томск, Россия, 2003. - С. 172-173.

13. Сравнение характеристик роста микобактерий туберкулеза на различных питательных средах / Соавт.: А.Г. Дурыманов, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопалов // Межрегиональная научная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика АМН СССР С.П. Карпова: Тез. докл. - Томск, Россия, 2003. – С. 51-52.
14. Change Virulence *Mycobacterium tuberculosis* complex at Long Cultivation on Various Mediums / Co-author: A.G. Durimanov, Yu.N. Rassadkin, N.A. Donchenko et al. // International Symposium "Integrative medicine" in International Congress "Progressive Scientific Technologies for Human Health": Proceeding - Ukraine, Kara-Dag, Feodosia (Crimea), 2003. – P. 23-24.



■ - 5055

РНБ Русский фонд

2004-4
33312