

Тауық эмбриондарында құс тұмауы вирусының оптималды өсіру жағдайлары вирустың мөлшеріне, өсіру уақытына, температурасына және тауық эмбрионының жасына байланысты анықталған

Summary

Optimal conditions for culturing bird influenza virus in developing chicken embryos were estimated depending on infection dose, incubation time, temperature and age of infected embryo.

УДК 57.043:579

Молдагулова Н.Б.¹, Ахметова Д.Г.¹, Кушугулова А.Р.¹, Секербаева А.М.²,
Абзалханова Г.Т.²

СОХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ СЕМЕЙСТВА *ENTEROBACTERIACEA*, ИМЕЮЩИХ МЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

¹ДГП «Республиканская коллекция микроорганизмов». Ярмамбетов К.Б. «Детская инфекционная больница», г. Астана, Казахстан, e.mail M_nazira1967@mail.ru.

²«Городская инфекционная больница», Омарбаева Б.К.³, «Региональный противотуберкулезный диспансер», Аманкулова У.П.⁴ ЦЭС РГКП, г. Семей, Казахстан

Семейство *Enterobacteriaceae* – самое многочисленное представительство микроорганизмов, вызывающих широко распространенные заболевания у людей, животных и растений [1, 2]. В медицинской практике уделяется большое внимание созданию коллекций штаммов бактерий, особенно выделенных из клинического материала. Такие коллекции могут быть использованы для изучения механизмов антибиотикорезистентности бактерий, проведения исследований антимикробного действия новых антибиотиков и разработки рациональных схем антибиотикотерапии в данной области. Для хранения микроорганизмов современным на сегодняшний момент, общепринятым методом является криохранение при температурах от минус 20 °С до 196 °С [3].

Криоконсервация (криоанабиоз) является наиболее перспективным методом долгосрочного хранения микроорганизмов [4]. При криоконсервации удается получить высокий уровень жизнеспособных клеток, титр которых при длительном хранении в жидком азоте сохраняется на исходном уровне, что делает практически неограниченным возможное время хранения [5]. Однако, грамотрицательные бактерии, к числу которых относится кишечная палочка, обладают повышенной чувствительностью к стрессовым воздействиям во время консервации. Это, по видимому, связано с химическим составом и строением их клеточной стенки и мембран [6]. Поэтому поиск оптимальных режимов хранения, обеспечивающих высокую жизнеспособность и стабильность биологических свойств грамотрицательных бактерий, является актуальным.

В «Республиканской коллекции микроорганизмов» проводятся исследования по созданию коллекции культур бактерий медицинского назначения, которые могут быть использованы в медицине и в биотехнологии для разработки тест-систем, хромогенных сред, для составления эпидемиологической карты и изучения антибиотикорезистентности выделенных культур, а также для выделения бактериофагов. При сборе коллекционных культур остро стоял вопрос о сохраняемости выделенных микроорганизмов. В связи с этим нами были изучены условия хранения культур семейства энтеробактерий.

Материалы и методы исследований.

Для работы использовали энтеробактерии выделенные из клинического материала. Материалы собирали из инфекционных больниц г. Астаны и г. Семей. Всего было выделено около 145 проб биоматериала из семейства энтеробактерий, относящихся к следующим родам: *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Morganella* и *Shigella*.

Для криоконсервации использовали следующие виды защитной среды:

- 50% глицерин+ триптозосоевый бульон;
- 20% глицерин+20% сахара+10% поливинилпироллидон;

- 20% глицерин+ триптозосоевый бульон+ 20% сахараза;
- (d)мясопептонный бульон+20% глицерин+20% сахараза+10% поливинил-пироллидон.

Для приготовления технической жидкости использовали суспензию бактериальных клеток в фазе экспоненциального роста. Стерильные защитные среды объемом 1 см³ разливали в пробирки с полным объемом 1,5см³, вносили культуру с активностью 10⁹ -10¹¹ КОЕ/см³ и подвергали постепенному охлаждению, по схеме: в первые 1-2 ч. выдерживали при температуре +4⁰ С, затем при минус 20⁰С в течение 10ч., а затем при минус 80⁰С. В процессе приготовления технической жидкости учитывали состав защитной среды в зависимости от ферментации микроорганизмов углеводов. Если культура не ферментирует сахарозу то в эти среды сахаразу, не добавляли.

Отогрев замороженных образцов производили на водяной бане при температуре +37⁰С. Жизнеспособность бактерий оценивали чашечным методом Коха в разведениях.

Протективные свойства защитных сред изучали через 6 - 12 сут при температуре хранения + 4⁰С и через 3, 6, 9, 12 мес. после хранения при температуре минус 80⁰С.

Результаты исследований.

Результаты поиска оптимальной защитной среды обеспечивающей максимальную сохраняемость криозамороженных образцов культур микроорганизмов, при температуре +4⁰С в течение 6 и 12 сут. представлены в таблице.

Таблица Оптимальные защитные среды для криоконсервации семейства энтеробактерий при температуре хранения + 4⁰С.

Наименование культуры	Защитная среда	Сроки хранения, сут	
		6	12
<i>Proteus</i> , <i>Enterobacter</i>	a, b	+	+
	c	+	-
	d	+	-
<i>Proteus</i> , <i>Enterobacter</i>	d	+	-
	a,b	+	+
	c	+	-
<i>Morganella</i>	d	+	-
	a,b,c	+	+
<i>Shigella</i>	d, c	+	-
	a,b	+	+

Оптимальными крипротективными свойствами обладали криозащитные среды а и в. Из данных таблицы видно, что использованные крипротективные среды а и в наиболее оптимальной защитной средой для энтеробактерий обладали все. Использованные протективные среды обеспечивали сохраняемость культур микроорганизмов при хранении температурного режима +4⁰С в течение 12 сут.

После получения положительных результатов по хранению микроорганизмов при условиях температурного режима + 4⁰С в течение 12 суток выделенные культуры подвергали долгосрочному хранению при низкой температуре (минус 80⁰С). Все выделенные культуры вносились в защитную среду и подвергались криозамораживанию при наиболее щадящем режиме хранения, описанном ранее криоконсервации [3]. Для изучения жизнеспособности при длительном режиме выделенные культуры, хранили при температуре минус 80⁰С. Жизнеспособность клеток проверяли после истечение 3, 6, 9, и 12 месяцев закладки на хранение. Выделенные культуры микроорганизмов имели высокую жизнеспособность после длительного хранения 12 месяцев в условиях низко температурного режима хранения при минус 80⁰С. Оценку качества биоматериала проводили путем сравнительного определения

количества жизнеспособных клеток бактерий до и после криоконсервации. При этом рост микробных клеток наблюдали в разведениях 10^9 и 10^{10} КОЭ/см³.

Литература

1. Павлович С.А. Микробиология с микробиологическими исследованиями. Минск, 2009 г. - С. 258.
2. Скородумов Д.И., Субботин В.В., Сидоров М.А., Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. - Москва, 2005 г. - С. 360-380.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. - М.: Медицина, 1973.
4. Cryogenic Preservation of Bacteria References /ATCC Connection. - 2006.- Vol. 26. - № 1.
5. Марценюк В.Ф. Жизнеспособность и биол. свойства *Escherichia coli*, и после хранения в жидком азоте в течении трех лет / В.Ф. Марценюк, Н.Г. Кадникова //Материалы Междунар. конференции.- Санкт-Петербург, 2004. - том 46. - №9. С. 819-824.
6. Preservation of marine bacteria by drying / K.Yamasato et al. // Princip.et appl.lyophil. prod. biol. Tokio, 1985. - P. 235-240.

Түйін

Enterobacteriaceae тұқымдасына жататын микроорганизімдердің культураларын минус 80⁰С ұзақ уақыт бойы сақтау режимдері анықталған. Бөлініп алынған микроорганизімдердің культуралары төменгі температурада жақсы сақталатындығы көрсетілген.

Summary

Abstract: Preservability of culture of enterobacteria family microorganisms under conditions of low temperature of minus 80 celcius degree was studied. The research that cultures possess nigh preservability during storage under conditions of low temperature.

УДК 619:616.76-022.6:615.371

Молдагулова Н.Б.¹, Кыдырбаев Ж.К.²

ОТРАБОТКА МНОЖЕСТВЕННОСТИ ИНФИЦИРУЮЩЕЙ ДОЗЫ И СРОКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО БУРСИТА КУР ИЗ ШТАММА «БГ» В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КФ

¹РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, г. Астана, Казахстан, e.mail M_nazira1967@mail.ru.

²РГП Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности КН МОН РК, п.г.т. Гвардейский, Казахстан

По литературным данным, вирус инфекционного бурсита кур успешно культивируется в первично-трипсинизированной культуре клеток КФ. Адаптированный культуральный вирус обладает высокой иммуногенностью, высокими титрами биологической активности, дает четко выраженное цитопатическое действие в виде округления и вокуолизацией клеток с последующим сползанием клеток от стенки стекла [1, 2, 3]. Вирус инфекционного бурсита кур способен реплицироваться и образовывать бляшки в монослойной культуре клеток фибробластов куриного эмбриона, при заражении фибробластов куриного эмбриона полевым штаммом Сu-1 образуются мелкие бляшки [4]. Некоторым исследователям [5] удалось адаптировать вирус ИБК в культуре клеток бурсы куриных эмбрионов и после 4-го пассажа вирус был размножен в культуре клеток куриных фибробластов и использован как аттенуированный живой вирус при производстве вакцин. Для аттенуации вируса используют эмбрионы кур и фибробласты куриных эмбрионов. Аттенуированный таким образом вирусы использованы для приготовления живой или инактивированной вакцины [1]. Таким путем был получен известный штамм «БГ» в России, полевой его предок выделен из фабрициевой сумки больных бройлеров птицефабрики «Уральская» Оренбургской области [6].

При отработке оптимальных параметров культивирования наиболее основным моментом технологии изготовления вакцинных препаратов является установление минимальной инфицирующей дозы вируса. Немаловажную роль при этом играет срок культивирования вирусосодержащего материала.