

УДК 619:579.841.93:616-064:577.2

© 2012

Орлов С. М., кандидат ветеринарних наук

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
Харків**ПОРІВНЯЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ВИДОВОЇ СТАБІЛЬНОСТІ ІЗОЛЯТІВ
І ШТАМІВ *BRUCELLA ABORTUS*****Рецензент – кандидат ветеринарних наук В. В. Білушко**

Проведено дослідження видової стабільності (культурально-морфологічні, антигенні властивості) 6 ізолятів, виділених у різні етапи викоренення бруцельозу в Україні, і 3 референтних штамів *Brucella abortus*. У висівах на поживні середовища життєздатними виявилися всі відібрані культури після тривалого зберігання в ліофільному стані за температури (4±1) °С упродовж 20–50 років. У процесі клонування було встановлено, що ізоляти й референтні штами зберегли типову видову характеристику бруцел у S- або RS-формах.

Ключові слова: антигенні властивості, життєздатність культур, клони, культурально-морфологічні властивості, *Brucella abortus*.

Постановка проблеми. В умовах широкої торгівлі й переміщення тварин на сучасному етапі відродження галузі тваринництва в Україні реально існує загроза заносу збудників бруцельозу. Особливо напружена епізоотична ситуація спостерігається щодо бруцельозу тварин і людей у Російській Федерації, де епідемічні пороги неблагополуччя й захворюваності значно перевищені. Так, на 1.11.2011 р. на території РФ зареєстровано 236 нових неблагополучних пунктів із бруцельозу великої рогатої худоби та 26 – бруцельозу дрібної рогатої худоби, а видова диференціація бруцел майже не проводиться [6].

У зв'язку з цим удосконалення методології контролю епізоотичних і виробничих штамів, системи епізоотологічного нагляду та моніторингу щодо бруцельозу тварин в Україні на популяційному й молекулярно-генетичному рівнях має актуальне значення.

Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми. В Україні для серологічної діагностики бруцельозу застосовують антигени з штаму *B. abortus* 19 у S-формі виробництва Херсонської біофабрики. Водночас у РФ для діагностичних реакцій розроблені антигени як із S- і R-варіантів, так і комплексний діагностикум, який є сумішшю S- і R-форм бруцел [2, 3, 5]. В окремих регіонах у процесі дослідження на бруцельоз і оцінку пост-

вакцинальних антитіл застосовують додатково RS-антиген [4]. У ході серологічних досліджень на бруцельозну інфекцію та оцінку рівня поствакцинальних антитіл ми застосували бруцельозний RS-антиген [1].

Мета дослідження – вивчити життєздатність ізолятів та штамів *Brucella abortus*, виділених у різні етапи викоренення бруцельозу в Україні, за культурально-морфологічними, тинкторіальними, антигенними властивостями та селекційонувати типові культури бруцел.

Матеріал і методи досліджень. Для досліджень використовували 6 культур *B. abortus*, ізольованих на початку і в кінці епізоотії бруцельозу в Україні, а також у міжепізоотичний період, що зберігалися в колекційному фонді бактеріальних культур лабораторії вивчення бруцельозу ННЦ «ІЕКВМ» у ліофільному стані за температури (4±1) °С упродовж 20–50 років. З урахуванням часо-територіальної характеристики епізоотичної ситуації в процесі оздоровлення країни від бруцельозу, для досліджень використовували 6 польових ізолятів від великої рогатої худоби *B. abortus* 48/3990 (ізольовано у 1960 р. в Запорізькій обл.), 28/210 (1963 р., Дніпропетровська обл.), 42/780 (1961 р., Донецька обл.), 34/394 (1963 р., Херсонська обл.), 88/7-26 (1963 р., в Україні, УНДІЕВ), 160/528 (1992 р., Луганська обл.). Крім того для досліджень були взяті 3 референтних штами *B. abortus* 19, 544 і В-1.

Після тривалого зберігання в ампулах ліофілізовану масу культури бруцел розчиняли в 1,0 см³ 0,85 % натрію хлориду (рН 6,8–7,2) і висівали на дві пробірки та чашки Петрі з м'ясо-пептонним печінково-глюкозо-гліцериним агаром (МППГТА) і на м'ясо-пептонний печінково-глюкозо-гліцериний бульйон (МППГГБ), вирощували за температури (37±0,5) °С упродовж 48–72 годин за звичайних умов в атмосфері (без додавання CO₂). Культурально-морфологічні властивості ізолятів і штамів вивчали за характером росту на поживних середовищах, відсутністю контамінації сторонньою мікрофлорою, шляхом мікроскопії мазків, пофарбова-

них за Грамом, Козловським та Стемпом. Після цього проводили повторний пересів культур і вивчали культуральні властивості на твердих, рідких і напіврідких середовищах для культивування бруцел, зокрема з тїонїном (1:25000, 1:50000, 1:100000) та фуксином (1:50000, 1:100000), утворення сірководню (H₂S), тести на дисоціацію – реакція з трипафлавіном і термоаглоутинація відповідно до стандартних методик. Антигенні властивості культур із метою визначення дисоціації досліджували у пластинчатій реакції аглоутинації (РА) на скельцях із родовими S-бруцельозною та R-бруцелаовісними сироватками (ННЦ «ІЕКВМ»). Визначали колоніальну однорідність 4-добових культур на МППГГА у чашках Петрі у нефарбованому й пофарбованому стані за Уайт-Вільсоном під мікроскопом МБС-2 зі збільшенням ×200. Однорідною вважали культуру, що мала не більше 5% дисоційованих форм. Подальшу селекцію

штамів проводили шляхом відсіву семи типових колоній на пробїрки з МППГГА, видїленням і дослідженням окремо семи клонів за вищезазначеними параметрами щодо дисоціації. Відбирали тільки 4 типові клони, які змішували й отримували одну відселекційовану культуру, яку досліджували на стабільність за всіма вищезазначеними тестами.

Результати досліджень. У висївах на поживні середовища життєздатними виявили всі відібрані 6 ізолятів та 3 штами *B. abortus* після тривалого зберігання в ліофільному стані і давали характерний ріст на МППГГА і МППГГБ, контамінацію сторонньою мікрофлорою не мали. У процесі мікроскопії мазків, пофарбованих за Грамом, Козловським та Стемпом, спостерїгали дрібні паличкоподібні 1,0–1,2 × 0,5–0,7 мкм бактерії рожевого та червоного кольорів. Проводили повторний пересів культур для наступних досліджень.

1. Порівняльні дослідження культуральних та антигенних властивостей ізолятів, видїлених у різні роки на території України, та штамів *Brucella abortus*

| Найменування культури | Клони | Потреба в CO ₂ | Продукують H ₂ S | Ріст на МПНРА з фарбами | | | | | Аглоутинація | | | |
|---------------------------|------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------|----------|---------|----------|-------------------|----------------------|--------------------------|------------------------|
| | | | | тїонїн | | | фуксин | | термоаглоутинація | трипафлавінова проба | РА на склі з сироватками | |
| | | | | 1:25000 | 1:50000 | 1:100000 | 1:50000 | 1:100000 | | | S-бруцельозна родова | R-бруцелаовісна родова |
| <i>B. abortus</i> 28/210 | 1–7 типові | - | # | - | - | - | ++ | +++ | - | - | # | - |
| <i>B. abortus</i> 34/394 | 1–7 типові | - | # | - | - | - | # | +++ | - | - | # | - |
| <i>B. abortus</i> 42/780 | 1–7 типові | - | # | - | -/+ | + | ++ | +++ | - | + | +++ | - |
| <i>B. abortus</i> 48/3990 | 1–7 типові | - | # | - | - | ++ | ++ | +++ | - | - | # | - |
| <i>B. abortus</i> 160/528 | 1–4 типові | - | # | - | - | - | ++ | +++ | - | - | # | - |
| | 5–6 дисоційовані | - | # | - | + | + | ++ | +++ | - | - | # | - |
| | 7 дисоційовані | - | # | - | + | ++ | ++ | +++ | - | - | # | +/- |
| <i>B. abortus</i> 88/7-26 | 1–4 типові | - | # | - | + | +++ | ++ | +++ | ++ 72 год | +++ | # | ++ |
| | 5–6 дисоційовані | - | # | - | + | +++ | ++ | +++ | - | +++ | # | ++ |
| | 7 дисоційовані | - | ++ | - | - | - | + | ++ | - | +/- | # | - |
| Референтні штами | | | | | | | | | | | | |
| <i>B. abortus</i> 19 | 1–7 типові | - | # | - | - | - | ++ | +++ | - | - | # | - |
| <i>B. abortus</i> 544 | 1–7 типові | - | # | - | - | - | +++ | +++ | - | - | # | - |
| <i>B. abortus</i> B-1 | 1–4 типові | - | - | - | + | + | ++ | +++ | + | ++ | # | - |
| | 5–7 дисоційовані | - | - | - | - | - | ++ | +++ | - | ++ | # | - |

2. Порівняльні дослідження культурально-тинкторіальних властивостей ізолятів і штамів *Brucella abortus*

| Найменування культури | Клони | Ріст на середовищах | | Ріст колоній на чашках Петрі | | Мікроскопія мазків | | |
|---------------------------|------------------|---|--------------------------------|--|--|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| | | МППГГА | МППГГБ | Непофарбовані | Пофарбовані за Уайт-Вільсоном | Стемп | Козловський | Грам |
| <i>B. abortus</i> 28/210 | 1–7 типові | ніжний з масляним блиском прозорий жовтуватий наліт | легке помутніння, осад – пункт | круглі, випуклі, гладкі з рівним краєм однорідні сіро-блакитні з лимонним центром колонії до 1 мм Ø* | колонії з лимонно-жовтим центром і блакитним краєм | темно-рожеві коки, палички | темно-червоні коки, палички | рожеві (Г-) дрібні коки та палички |
| <i>B. abortus</i> 34/394 | 1–7 типові | ніжний з масляним блиском прозорий жовтуватий наліт | легке помутніння, осад – пункт | круглі, випуклі, гладкі з рівним краєм однорідні сіро-блакитні з лимонним центром колонії 0,4–1 мм Ø | лимонно-жовтий центр, синій край | темно-рожеві овоїди, палички | темно-червоні палички, овоїди | рожеві овоїди, короткі палички |
| <i>B. abortus</i> 42/780 | 1–7 типові | ніжний з масляним блиском прозорий жовтуватий наліт | легке помутніння, осад – пункт | круглі, випуклі, гладкі з рівним краєм дуже дрібні з лимонним центром сіро-блакитні колонії 0,4–0,6 мм Ø | лимонно-жовтий центр, край блакитний | темно-рожеві кокобактерії | червоно-цегляні кокобактерії | рожеві дрібні коки |
| <i>B. abortus</i> 48/3990 | 1–7 типові | ніжний з масляним блиском прозорий жовтуватий наліт | легке помутніння, осад – пункт | круглі, випуклі, гладкі з рівним краєм однорідні сіро-блакитні з лимонним центром колонії до 1 мм Ø | лимонно-жовтий центр, блакитний край | темно-рожеві коки | червоно-цегляні кокобактерії | рожеві короткі палички |
| <i>B. abortus</i> 160/528 | 1–4 типові | ніжний з масляним блиском прозорий жовтуватий наліт | легке помутніння, осад – пункт | круглі, випуклі, гладкі з рівним краєм сіро-блакитні з лимонним центром колонії до 1–1,2 мм Ø | колонії з лимонно-жовтим центром і вузьким синім краєм | темно-рожеві дрібні коки та овоїди | червоно-цегляні дрібні коки | рожеві дрібні коки та овоїди |
| | 5–6 дисоційовані | ніжний з масляним блиском прозорий жовтуватий наліт | легке помутніння, осад – пункт | круглі, випуклі, гладкі з рівним краєм сіро-блакитні колонії з лимонним центром до 0,6–0,8 мм Ø | лимонно-жовтий центр, блакитний край | темно-рожеві дрібні коки та овоїди | червоно-цегляні дрібні коки | рожеві дрібні коки та овоїди |
| | 7 дисоційовані | ніжний з масляним блиском прозорий жовтуватий наліт | легке помутніння, осад – пункт | круглі, випуклі, гладкі з рівним краєм сіро-блакитні з жовтим центром колонії до 0,4–0,6 мм Ø | лимонно-жовтий центр, блакитний край | темно-рожеві дрібні коки та овоїди | червоно-цегляні дрібні коки | рожеві дрібні коки та овоїди |

ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА

| Найменування культури | Клони | Ріст на середовищах | | Ріст колоній на чашках Петрі | | Мікроскопія мазків | | |
|------------------------------|------------------|---|---------------------------------------|--|--|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| | | МППГГА | МППГГБ | непофарбовані | пофарбовані за Уайт-Вільсоном | Стемп | Козловський | Грам |
| <i>B. abortus</i> 88/7-26 | 1–4 типові | ніжний напівпрозорий жовтий наліт | легке помутніння, осад – аглютинат | круглі, випуклі, зернисті з рівним краєм сіро-блакитні з помаранчово-жовтим центром крупні колонії до 1–1,5 мм Ø | колонії з світло-фіолетовим центром і фіолетовим краєм | темно-рожеві коки, короткі палички | червоно-цегляні і коки, палички | рожеві дрібні коки та палички |
| | 5–6 дисоційовані | ніжний напівпрозорий жовтий наліт | легке помутніння, осад – пухкий пункт | круглі, випуклі, слабозернисті з рівним краєм сіро-блакитні з жовтим центром колонії до 1–1,2 мм Ø | лимонний центр, синій край | темно-рожеві коки, короткі палички | червоно-цегляні і коки, палички | рожеві дрібні коки та палички |
| | 7 дисоційовані | ніжний прозорий жовтуватий наліт | легке помутніння, осад – пункт | круглі, випуклі, гладкі з рівним краєм сіро-блакитні з жовтим центром колонії до 1–1,2 мм Ø | лимонно-жовтий центр з блакитною краєм | темно-рожеві коки, короткі палички | червоно-цегляні і коки, палички | рожеві дрібні коки та палички |
| Референтні штами | | | | | | | | |
| <i>B. abortus</i> 19 | 1–7 типові | ніжний з масляним блиском прозорий жовтуватий наліт | легке помутніння, осад – пункт | круглі, випуклі, гладкі з рівним краєм сіро-блакитні з лимонним центром колонії до 1 мм Ø | лимонно-жовтий центр, блакитний край | темно-рожеві коки | червоно-цегляні дрібні коки | рожеві коки |
| <i>B. abortus</i> 544 | 1–7 типові | ніжний з масляним блиском прозорий жовтуватий наліт | легке помутніння, осад – пункт | круглі, випуклі, гладкі з рівним краєм сіро-блакитні з лимонним центром колонії 0,4–0,8 мм Ø | лимонно-жовтий центр, блакитний край | темно-рожеві дрібні коки | темно-червоні дрібні коки | рожеві дрібні коки |
| <i>B. abortus</i> B-1 | 1–4 типові | ніжний напівпрозорий жовтий наліт | легке помутніння, осад – аглютинат | круглі, випуклі, напівзернисті з рівним краєм сіро-блакитні з жовтим центром колонії 0,8–1 мм Ø | червоний центр, синій край | темно-рожеві коки | червоно-цегляні дрібні коки | рожеві дрібні коки та овоїди |
| | 5–7 дисоційовані | ніжний прозорий жовтуватий наліт | легке помутніння, осад – пухкий пункт | круглі, випуклі, гладкі з рівним краєм сіро-блакитні з жовтуватим центром колонії 0,6–0,8 мм Ø | лимонно-жовтий з блакитним краєм | темно-рожеві коки | червоно-цегляні дрібні коки | рожеві дрібні коки та овоїди |

Примітка: * – діаметр колонії

Встановлено, що 7 культур (5 ізолятів, 2 штамми 19, 544) *B. abortus* у S-формі добре росли на МППГГА у вигляді прозорого нальоту з маслянистим блиском і на бульйоні мали рівномірне легке помутніння з пунктом на дні за звичайних умов в атмосфері вирощування; всі культури утворювали H_2S . Типові культури *B. abortus* росли на м'ясо-пептонному напіврідкому агарі (МПНРА) з фуксином у концентрації 1:50000 й не росли на середовищі, що містить тіонін у тій же концентрації. В тестах на дисоціацію дані культури бруцел давали негативні реакції з трипафлавіном і термоаглютинацію. Досліджуючи антигенні властивості бруцел у РА на скельцях виявили аглютинацію із S-бруцельозною родою і негативну реакцію з R-бруцелаовісною родою сироватками (табл. 1). У посівах на МППГГА в чашці Петрі на 4-ту добу інкубації культури росли у вигляді круглих, випуклих, гладких, розміром від 0,5 до 1,2 мм у діаметрі колоній, які при боковому освітленні були сіро-блакитні, з лимонним центром, а після фарбування за Уайт-Вільсоном – мали лимонно-жовтий центр і синій або блакитний край (табл. 2).

У процесі дослідження культур *B. abortus* 88/7-26 та В-1 в RS-формі встановлено, що культури росли на МППГГА у вигляді напівпрозорого нальоту й на бульйоні мали опалесценцію з аглютинатом на дні, утворювали H_2S (крім *B. abortus* В-1), росли на МПНРА з фуксином (1:50000) і росли на середовищі з тіоніном (1:50000), давали аглютинацію з родовими S-бруцельозною і R-бруцелаовісною сироватками, з трипафлавіном і в пробі термоаглютиції (через 72 години). У посівах на МППГГА в чашці Петрі культури росли у вигляді круглих (від

0,5 до 2,0 мм у діаметрі), випуклих, зернистих колоній, які при боковому освітленні набували сіро-блакитного кольору з помаранчево-жовтим центром, а після фарбування за Уайт-Вільсоном мали фіолетовий колір із червоним відтінком у центрі.

Однорідною визначали культуру, що мала не більше 5 % дисоційованих форм. Селекцію ізолятів і штамів проводили шляхом відсіву семи типових колоній, виділення і дослідження окремо цих клонів за тестами щодо дисоціації. Відібрані 4 типові клони змішували й отримували одну відселекційовану культуру, яку досліджували на стабільність.

Таким чином, усі ці властивості свідчили, що 6 польових ізолятів і 2 контрольних штамми *B. abortus* були селекційовані в стабільній S-формі, а один ізолят і штам *B. abortus* – у RS-формі.

На підставі отриманих даних у майбутньому передбачаються дослідження епізоотичних і виробничих штамів *B. abortus* на молекулярно-генетичному рівні, розробки сучасних видоспецифічних ПЛР-тест-систем ідентифікації бруцел.

Висновки:

1. У ході визначення життєздатності шести польових ізолятів, виділених у різні етапи викоренення бруцельозу в країні, і трьох референтних штамів *B. abortus* виявили живими всі культури після тривалого зберігання в ліофільному стані за температури $(4\pm 1)^\circ C$ упродовж 20–50 років.

2. За культурально-морфологічними, тинкторіальними та антигенними властивостями встановлено, що відселекційовані культури *B. abortus* мали типову видову характеристику бруцел у S- та RS-формах.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Орлов С. М. Імуногенність і антигенність інактивованих емульсин-вакцин проти інфекційного епідидиміту баранів із штамів *Brucella abortus* та *Brucella ovis* : Дис. ... канд. вет. наук. – Х., 2004. – 146 с.
2. Патент RU № 2203499 С1, РАПТЗ 2003 А61К39/10. Спосіб постановки діагностическої реакції при бруцеллезе / Игнатов П. Е.; Федоров А. И.; Мельниченко Л. П.; РФ № 2001124871/13; заявл. 09.12.01; опубл. 27.04.03. – 7 с.
3. Роньшина Н. В. Эпизоотологическая диагностика бруцеллеза в популяции крупного рогатого скота на завершающем этапе оздоровления : автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. – Нижний Новгород, 2009. – 23 с.

4. Суслицын А. В. Усовершенствованная схема эпизоотической оценки по бруцеллезу стад крупного рогатого скота, привитого вакциной из штамма *B. abortus* 82 : автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. – Новосибирск, 2005. – 20 с.
5. Фомин А. М. Разработка и совершенствование средств и методов диагностики и специфической профилактики при бруцеллезе крупного рогатого скота : автореф. дис. ... докт. вет. наук: 03.00.07, 16.00.03. – Казань, 2001. – 47 с.
6. Эпизоотическая ситуация по особо опасным болезням животных на территории Российской Федерации на 1.11.2011 г. ФГУ «Центр ветеринарии» (Официальный интернет-портал <http://vet-center.ru/page5.php>).