

УДК 619:616.981.51

РУБЛЕНКО І.О., канд. вет. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

СКРИПНИК В.Г., д-р вет. наук

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної
діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

МАЧУСЬКИЙ О.В., канд. вет. наук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології
і штамів мікроорганізмів, м. Київ

УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДИКИ ВИДІЛЕННЯ СПОР СИБІРКИ ІЗ ҐРУНТУ БАКТЕРІОЛОГІЧНИМ МЕТОДОМ

Наведені дані щодо удосконалення методу виділення спор *Bac. anthracis* із ґрунту. За результатами проведених досліджень встановлено, що виділення спор із ґрунту необхідно проводити з використанням детергента Тритону Х-100, фільтрованого 1 % бичачого сироваткового альбуміну у 0,01 моль/мл фосфатно-сольовому буфері, що дозволяє виділити більшу (за методикою №5 на поживному середовищі PLET виділяється 19,66 % клітин від внесених, а за методиками №1, 2 (3), 4 – 3,3, 1,61 та 6,46 %) кількість спор із ґрунту, ніж за методикою описаною у "Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды. Методические указания".

Ключові слова: сибірка, виділення, спори, ґрунт, культивування.

Постановка проблеми. Статистичні дані щодо захворювання тварин та людей на сибірку, за останні роки, свідчать про поступове зниження її спалахів на території України. Водночас ризик виникнення нових спалахів захворювання зберігається десятиліттями [1]. За даними ВООЗ, найбільша захворюваність на сибірку припадає на територію Європи [2, 3].

Аналіз досліджень і публікацій. Згідно з літературними даними [4–9], основною проблемою щодо виникнення цієї інфекції є недостатня захищеність старих місць захоронень тварин, які не відповідають вимогам біологічної безпеки, створюють постійну, потенційну загрозу появи захворювання не лише серед тварин, а й серед людей.

Одним із особливих аспектів довготривалого зберігання збудника є склад ґрунту та кліматичні умови України (рис. 1). Ґрунтовий покрив території України представлений переважно чорноземними типами ґрунтів, які за своїми фізико-хімічними властивостями є сприятливими для виживання, перебування та розмноження збудника сибірки [1, 2].

Окрім того, здебільшого не всім тваринам вчасно проводять вакцинацію [3, 10], що створює умови для інфікування невакцинованих тварин.

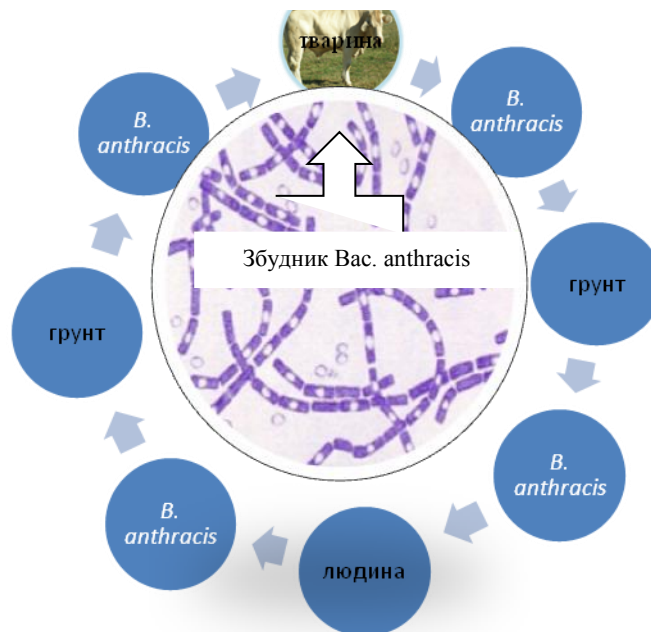


Рис. 1. Схема циркуляції збудника *Bac. anthracis*.

Не зважаючи на позитивні результати боротьби з сибіркою, у державної ветеринарної та фітосанітарної служби України на сьогодні залишається багато питань, які потребують удосконалення [10] щодо виділення *Bac. anthracis* із ґрунту та біологічного матеріалу.

Нині на території України використовують методика з методичних рекомендацій «Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды», (989) [11] та методика затверджену Міністерством охорони здоров'я України (2003) [12]. Проте, через велику кількість супутньої спорової сапрофітної мікрофлори у ґрунті, вони потребують удосконалення.

Мета роботи полягала в удосконаленні методів виділення спор *Bac. anthracis* із ґрунту.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводили на базі Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ). Для виконання роботи використовували стерильний ґрунт, який стерилізували в автоклаві за 1,5 атм протягом 20 хв, двічі, впродовж двох діб.

У дослідженнях до стерильного ґрунту додавали різну кількість спор, отриманих із суспензії штаму *Bac. anthracis* UA-07, який наданий Національним центром штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ.

Спори *Bac. anthracis* виділяли за методиками описаними у «Інструкції з лабораторної діагностики сибірки у людей, в сировині тваринного походження та об'єктах довкілля» (методика № 1) [13], «Лабораторная диагностика сибирской язвы у людей и выделение возбудителя сибирской язвы из объектов внешней среды» (методика № 2) [14], «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания. МУК 4.2.2413–08» (методика № 3) [15], «Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores» (методика № 4) [16] та модифікованій нами методиці «The secret life of the Anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage mediated ecological adaptations» (методика № 5) [17].

Використовували спорову суспензію із штаму *Bac. anthracis* UA-07, отриману методом серійних розведень у стерильному поживному середовищі МПБ.

Розведення (10⁻²–10⁻⁶) вносили у флакони зі стерильним ґрунтом по 0,2 см³. Подальші дослідження проводили відповідно до зазначених вище методик. Досліджувану суспензію висівали на поживні середовища МПА (м'ясо-пептонний агар), кров'яний МПА, середовища PLET та агар Хоттінгера, содовий МПА. Культивували за температури 37 °С протягом 24–48 год. Для отримання достовірних результатів провели 3 серії досліджень.

Результати досліджень та їх обговорення. Після культивування посівів, було виявлено значну відмінність у кількості колонієутворювальних одиниць (КУО) на різних поживних середовищах: м'ясо-пептонному агарі (МПА), кров'яному м'ясо-пептонному агарі (КМПА), агарі Хоттінгера, содовому м'ясо-пептонному агарі (СМПА), триптон-соєвому агарі (ТСА) та середовищі PLET (рис. 2). Згідно із отриманими результатами досліджень, для виділення спор *Bacillus anthracis* із ґрунту, використовували середовища – МПА та PLET.

У зв'язку з тим, що методики № 2 та 3 за дослідження ґрунту на наявність спор подібні, то ж і результати отримали ідентичні (табл. 2, рис. 3). За результатами досліджень, при використанні методики №1, кількість спор внесених у 100 г ґрунту була найвищою (6969,0±9,46), порівняно з даними методик № 2–5. Проте, за допомогою методики № 1, при використанні поживного середовища МПА, з концентрацією 6969,0±9,46 спор у ґрунті масою 100 г в середньому виділяли 200 КУО, що вірогідно (p<0,001) більше на 157 КУО порівняно з методикою № 2, проте на 100 клітин менше – порівняно з методикою № 5 (p<0,001).

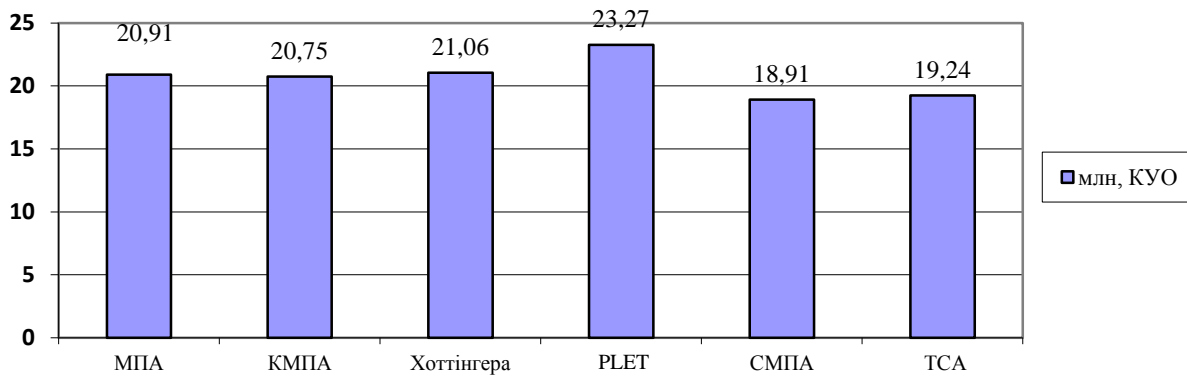


Рис. 2. Кількість спор *Bac. anthracis*, що вирости на різних поживних середовищах, КУО.

Таблиця 2 – Найменша кількість спор *Bacillus anthracis*, що виділяється з ґрунту різними методами

| Показник дослідження | № 1 | № 2–3 | № 4 | № 5 | Контроль стерильний ґрунт 1:10–106 |
|---|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|---|
| | ступінь розведення спор у МПБ | | | | |
| Найбільший ступінь розведення, в якому виділено спори | 1: 103, n=6 | 1:103, n=6 | 1:104, n=7 | 1:105, n=7 | |
| Кількість спор у 100 г ґрунту до дослідження | 6969,0±9,46 | 4402,0±6,01 | 4181,0±5,68 | 1673,0±2,29 | 0 |

Під час дослідження зразків за методиками № 1–5 кількість КУО була однаковою ($p < 0,05$) і за культивування на середовищах PLET та МПА, ніж за використання для культивування середовища МПА, що було вірогідно ($p < 0,001$) більше кількості КУО відносно результатів, отриманих за методикою № 2, але, водночас, вірогідно ($p < 0,01$) менше відносно показників, отриманих за методикою № 5.

Тобто, за методикою № 1, виділяли лише 200 КУО, за концентрації 6969 спор у 100 г ґрунту, що відповідало 2,87 % від загальної кількості внесених спор у ґрунт.

Згідно з методиками № 2 і 3 на МПА було виділено найменшу кількість КУО *Bac. anthracis* – 43, порівняно з методиками № 1 та 5 – 200 і 300 відповідно. При цьому кількість внесених спор в 100 г ґрунту була на 221 більшою ніж у ґрунт, досліджений за методикою № 4, та на 2729 – згідно з методикою № 5.

Кількість спор у 100 г ґрунту, при визначенні за методикою № 4, становила 4181 КУО (за використання середовища МПА). Тобто, за допомогою цієї методики виділяється 4,09 % КУО, що на 1,22 % більше порівняно з отриманими даними методики № 1, та на 3,12 % більше, ніж за методиками № 2 та 3.

За допомогою методики № 5 було виділено 300,0±0,22 КУО (за внесення 1673 спор на 100 г ґрунту). Проте, кількість внесених у 100 г ґрунту спор була на 5296 спор менше, порівняно з кількістю спор внесених за методикою № 1 та на 2729 – за методиками № 2, 3 і на 2508 – за методикою № 4.

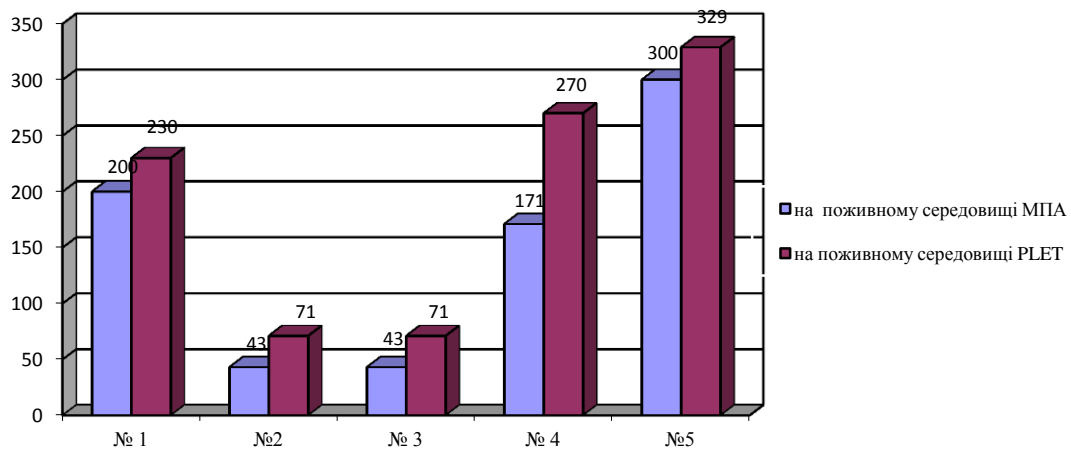


Рис. 3. Кількість клітин, що виділяється за різними методиками, КУО.

Слід відмітити, що методика № 5 більш ефективна, порівняно з іншими методиками, оскільки за неї виявляються спори за найменшої їх кількості у перерахунку на 100 г ґрунту.

Висновки. За результатами досліджень, застосування методики №5 для виділення спор із ґрунту є більш ефективним, порівняно з методиками №1–4, що підтверджується більшою кількістю виділення КУО з ґрунту на поживних середовищах МПА та PLET. Водночас, за цієї методики для дослідження необхідно всього 2,5 г ґрунту, тоді як за методикою №1 – 60 г, за методиками № 2 і 3 – 95, № 4 – 10 г. Окрім того, методика № 5 не потребує великих затрат часу і реактивів.

У перспективі подальших досліджень планується відпрацювання методики виділення спор *Bacillus anthracis* із нестерильного ґрунту.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Іовенко А. Вплив ґрунтового фактора на розташування стаціонарно неблагополучних пунктів на території південного регіону України / А. Іовенко // Вет. медицина України. – № 11. – 2004. – С. 12–14.
2. Сибірка в Україні. Епідеміологічний аналіз за 55 років (1946–2001) / О.О. Бобильова, Л.М. Мухарська, Л.С. Некрасова, Л.П. Нестеренко // Сучасні інфекції. – 2002. – №2. – С. 4–7.
3. Муминов А.А. Географическое распространение и основные черты эпизоотологии сибирской язвы в Таджикистане / А.А. Муминов, Д.С. Девришов // Ветеринарная медицина. – 2012. – № 2. – С. 57–61.
4. Шариков М.С. Эпизоотический потенциал сибирезывенных захоронений в районах Закамья республики Татарстан: автореф. дис. на соискание уч. степени кандидата биол. наук: спец. 16.00.03 «ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология» / М.С. Шариков. – Уфа, 2009. – 25 с.
5. Монсонов А.В. Микробиологический мониторинг почв животных и скотомогильников на территории Забайкальского края: автореф. дис. на соискание уч. степени кандидата вет. наук: спец. 16.00.03 «ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология» / А.В. Монсонов. – Улан-Удэ, 2010. – 22 с.
6. Three probable cases of cutaneous anthrax in autonomous province Vojvodina, Serbia / [P. Duric, G. Cosic, S. Rajcevic [et al.]] // J. Weekly issue. – 2012. – № 17. – P. 2–6.
7. Диагностика сибирской язвы в Российской Федерации / Е.И. Еременко, Н.П. Буравцева, А.Н. Куличенко, А.Г. Рязанова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2010. – 35. – С. 62–66.
8. Cutaneous anthrax in eastern Turkey / H. Caksen, F. Arabaci, M. Abuhandan [et al.] // Cutis. – 2001. – № 67. – P. 488–492.
9. Allelespecific competitive blocker PCR: a one-step method with applicability to pool screening / A. Orou, B. Fechner, G. Utermann, H.J. Menzel // Hum. Mutat. – 1995. – 6, № 2. – P. 163–169.
10. Завірюха Г.М. Розробка нової технології виготовлення антигену сибірського стандартного: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня кандидата сільськогосподарських наук: спец. 03.00.20 «біотехнологія» / Г.М. Завірюха. – Біла Церква, 2002. – 18 с.
11. Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды. Методические указания / Государственный агропромышленный комитет СССР. М., 1989. – 33 с.
12. Методичні рекомендації з епідеміології та профілактики сибірки у людей, про заходи з профілактики захворювань на сибірку: затверджена Міністерством Охорони здоров'я України, (наказ № 314 від 09.07.2003р м. Київ).

13. Інструкції з лабораторної діагностики сибірки у людей, в сировині тваринного походження та об'єктах довілля: Наказ МОЗ України від 21.08.2002, №321.
14. Инструкция 4.2.10–19–60–2005. Лабораторная диагностика сибирской язвы у людей и выделение возбудителя сибирской язвы из объектов внешней среды: Постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 21 ноября 2005, № 181.
15. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания. МУК 4.2.2413–08: Утверждено Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко от 29 июля 2008.
16. Dragon D.C. Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores / D.C. Dragon, R.P. Rennie // *The Society for Applied Microbiology*. – 2001. – № 33. – P. 100–105.
17. Schuch R. The secret life of the Anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage mediated ecological adaptations / Raymond Schuch, Vincent A. Fischetti // *Plos one. A Peer-Reviewed, one. Access journal*. – 2009. – № 4(8). – P. 6532.

REFERENCES

1. Iovenko A. Vplyv gruntovoho faktora na rozstahuvannya statsionarno neblahopoluchnykh punktiv na terytoriyi pivdennoho rehionu Ukrainy / A. Iovenko // *Vet. medycyna Ukrainy*. – № 11. – 2004. – S. 12–14.
2. Sybirka v Ukraini. Epidemiolohichnyy analiz za 55 rokov (1946–2001) / O.O. Bobyl'ova, L.M. Mukhars'ka, L.S. Nekrasova, L.P. Nesterenko // *Suchasni infektsiyi*. – 2002. – №2. – S. 4–7.
3. Muminov A.A. Geograficheskoe rasprostranenie i osnovnye cherty jepizootologii sibirskoj jazvy v Tadzhikistane / A.A. Muminov, D.S. Devrishov // *Veterinarnaya medicina*. – 2012. – № 2. – S. 57–61.
4. Sharikov M.S. Jepizooticheskiy potencial sibirejazvennykh zahoroneniij v rajonah Zakam'ja respubliki Tatarstan: avtoref. dis. na soiskanie uch. stepeni kandidata biol. nauk: spec. 16.00.03 «veterinarnaya mikrobiologija, virusologija, jepizootologija, mikologija s mikotoksikologiej i immunologija» / M.S. Sharikov. – Ufa, 2009. – 25 s.
5. Monsonov A.V. Mikrobiologicheskij monitoring pochv zhivotnyh i skotomogil'nikov na territorii Zabajkalskogo kraja: avtoref. dis. na soiskanie uch. stepeni kandidata vet. nauk: spec. 16.00.03 «veterinarnaya mikrobiologija, virusologija, jepizootologija, mikologija s mikotoksikologiej i immunologija» / A.V. Monsonov. – Ulan-Udje, 2010. – 22 s.
6. Three probable cases of cutaneous anthrax in autonomous province Vojvodina, Serbia / [P. Duric, G. Cosic, S. Rajcevic [et al.] // *J. Weekly issue*. – 2012. – № 17. – P. 2–6.
7. Diagnostika sibirskoj jazvy v Rossijskoj federacii / E.I. Eremenko, N.P. Buravceva, A.N. Kulichenko, A.G. Rjazanova // *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii immunologii*. – 2010. – 35. – S. 62–66.
8. Cutaneous anthrax in eastern Turkey / H. Caksen, F. Arabaci, M. Abuhandan [et al.] // *Cutis*. – 2001. – № 67. – P. 488–492.
9. Allelespecific competitive blocker PCR: a one-step method with applicability to pool screening / A. Orou, B. Fehner, G. Utermann, H.J. Menzel // *Hum. Mutat*. – 1995. – 6, № 2. – P. 163–169.
10. Zaviryukha H.M. Rozrobka novoyi tekhnolohiyi vyhotovlennya antyhenu sybirkovoho standartnoho: avtoref. dys. na zdobuttya nauk. stupenya kandydata sil'skohospodars'kykh nauk: spets. 03.00.20 «biotekhnolohiya» / H.M. Zaviryukha. – Bila Tserkva. – 2002. – 18 s.
11. Laboratornaya diagnostika sibirskoj jazvy u zhivotnyh i ljudej, obnaruzhenie vozбудitelja v syr'e zhivotnogo proishozhdenija i ob'ektah vneshnej sredy. Metodicheskie ukazaniya / Gosudarstvennyj agropromyshlennyj komitet SSSR. M., 1989. – 33 s.
12. Metodichni rekomendacii' z epidemiologii' ta profilaktyky sybirky u ljudej, pro zahody z profilaktyky zahov-rjuvan' na sybirku: zatverdzhena Ministerstvom Ohorony zdorov'ja Ukrainy, (nakaz № 314 vid 09.07.2003r m. Kyi'v).
13. Інструкції з лабораторної діагностики сибірки у людей, в сировині тваринного походження та об'єктах до-вкілля: Наказ МОЗ України від 21.08.2002, №321.
14. Инструкция 4.2.10–19–60–2005. Laboratornaya diagnostika sibirskoj jazvy u ljudej i vydelenie vozбудitelja sibirskoj jazvy iz ob'ektov vneshnej sredy: Postanovlenie Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha Respubliki Belarus' ot 21 nojabrja 2005, № 181.
15. Laboratornaya diagnostika i obnaruzhenie vozбудitelja sibirskoj jazvy. Metodicheskie ukazaniya. MUK 4.2.2413–08: Utverzhdeno Rukovoditelem Federal'noj sluzhby po nadzoru v sfere zashhity prav potrebitelej i blagopoluchija cheloveka, Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom Rossijskoj Federacii G.G. Onishhenko ot 29 ijulja 2008.
16. Dragon D.C. Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores / D.C. Dragon, R.P. Rennie // *The Society for Applied Microbiology*. – 2001. – № 33. – P. 100–105.
17. Schuch R. The secret life of the Anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage mediated ecological adaptations / Raymond Schuch, Vincent A. Fischetti // *Plos one. A Peer-Reviewed, one. Access journal*. – 2009. – № 4(8). – P. 6532.

Совершенствование методики выделения спор сибирской язвы с почвы бактериологическим методом И.А. Рубленко, В.Г. Скрипник, О.В. Мачуський

Приведены данные по совершенствованию метода выделения спор *Bac. anthracis* с почвы. По результатам проведенных исследований установлено, что выделение спор из почвы необходимо проводить с использованием детергента Тритона X-100, фильтрованного 1 % бычьего сывороточного альбумина в 0,01 моль/мл фосфатно-солевом буфере, что позволяет выделить значительно большее (по методике № 5 на питательной среде PLET выделяется 19,66 % клеток с внесенных, а по методикам № 1, 2 (3), 4 – 3,3, 1,61 и 6,46 %) количество спор из почвы, чем по методике, описанной в "Инструкции по лабораторной диагностике сибирской язвы у людей, в сырье животного происхождения и объектах окружающей среды".

Ключевые слова: сибирская язва, выделение, споры, почва, культивирование.

Improvement of the soil bacteriological research methods on existence of anthrax spores

I. Rublenko, V. Skripnik, O. Machuskiy

Statistical data on diseases of animals and humans anthrax in recent years show a gradual decrease of outbreaks in Ukraine. However, the risk of new outbreaks of the disease is stored for decades. According to WHO data, the greatest incidence of anthrax falls on the territory of Europe.

The aim of our study was to improve the selection method of dispute *Bac. anthracis* from soil. It is known that anthrax the pathogen *Bacillus anthracis* is not fastidious to nutrient, grows well on ordinary nutrient media. After cultivation of sowings it was found a slight difference in the number of units that form colonies (CFU) at different nutrient mediums: meat-peptone agar (MPA) MPA blood, Hettinger's agar, soda MPA, trypton-soy agar (TSA) and environment PLET.

According to the obtained of preliminary results of studies to extract *Bacillus anthracis* spores from the soil we have used the mediums MPA and PLET. Due to the fact that the methods №2 and №3 of soil investigation on the presence of spores as described in the guidelines "Laboratory diagnosis of anthrax in humans and extraction of anthrax from objects in the environment" and "Laboratory diagnosis and detection of anthrax" are identical, so we have received identical results.

By results of researches while studying methods № 1 the number of spores introduced in 100 g soil was highest (6969±9,46), compared to techniques according to № 2–5. However, using the methodology № 1, when using the nutrient medium MPA, with concentration 6969 spores in the 100 g soil mass in average were extracted 200 CFU significantly lower ($p<0,001$), that probably higher at 157 of cells compared with the method № 2, but in 100 cells decrease with method № 5 ($p<0,001$).

During the research of the samples with the method №1 and cultivation in medium PLET was showed insignificantly greater amount of CFU (30 CFU) than in the medium of the cultivation MPA, which was significantly ($p<0,001$) higher, number of CFU relative to the results obtained by the method № 2, at the same time, but significantly ($p<0,01$) lower relative performance obtained by the methods № 5.

That is, with the method №1, only 200 CFU were extracted at the concentration of 6969 spores per 100 g of soil, which corresponded to 2,87% of the total number of spores introduced into the soil. According to the results of research with the method № 2, № 3 on the MPA was exacted the least amount of CFU – 43 comparing to the № 1 and № 5 methods – 200; 300, respectively. The amount of spores, introduced into the 100 g of soil was per 221 units more compared with the method № 4, and per 2729 more than in the soil with the method № 5.

The quantities of spores in 1 g of soil when determining with the method № 4 was 4182 CFU, so with this method is extracted CFU 4,09% that per 1,22% more, compared with the data obtained in the first method and per 3,12% more, compared with indicators obtained with the method № 2 and № 3.

With applying the methodology № 5 it was extracted 300±0,22 CFU, while making 1673 spores per 100 g of soil. That was on 5297 spores in 100 g soil less, compared to the number of spores made with the method № 1 and per 2729 – with the method № 2, and per 2508 – with the method № 4.

It should be noted, that this method (№ 5) is more effective, compared with other methods. It detects spores at the their slightest amount in 100 g of soil. However, with this method it is necessary to study only 2,5 g soil, whereas with the method of № 1 – 60 g, with the method of № 2 – 95 g, № 4 – 10 g.

It should be mentioned, that the reliability of the results is much higher with the method № 5, while it does not require large expenditures of time and reagents.

The results of the application of the methodology for the allocation of № 5 soil of spores is more effective compared to methods № 1–4, it is confirmed more allocation CFU of 100 g soil on nutrient media and MPA and PLET. This technique gives the opportunity to achieve results that will have a higher degree of reliability. In the future, further testing techniques planned selection spores *Bacillus anthracis* is non-sterile soil.

Key words: anthrax, extraction, spores, soil, cultivation.

Надійшла 27.10.2015 р.