

УДК 636.09:615.371:616-078:616.98

Л. І. АКІМЕНКО кандидат біологічних наук
Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

В. Г. КОШЕЛЬНИК, директор

Т. О. ТЕРПЕЦЬКА, в.о. начальника відділення біологічного контролю

В. М. НАХАБІН начальник цеху по виробництву біопрепаратів

Л. М. КАЛУГІНА, мікробіолог цеху

Державне підприємство - Херсонська біологічна фабрика

ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ СИРОВИННОЇ БАЗИ ВИГОТОВЛЕННЯ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЬОЗУ

*У статті висвітлені результати перевірки властивостей штамів мікроорганізмів *Brucella abortus* 19, *Brucella abortus* В1, *Brucella abortus* 104 М на відповідність паспортним характеристикам. Вказані штами мікроорганізмів є сировинною базою для виробництва Державним підприємством Херсонська біологічна фабрика (ДПХБФ) діагностичній препаратів.*

Ключові слова: діагностичні препарати, виробничі штами мікроорганізмів.

Виробництво діагностичних препаратів для постановки діагнозу на бруцельоз в Україні має давню історію. Освоєння технології виробництва «Антигену бруцельозного для кільцевої реакції з молоком (КР) розпочалося ще в 1960 р. На той час була розроблена та затверджена тимчасова інструкція по виготовленню та контролю антигену, а ТУУ були затверджені у 1973 році.

У 1976 році згідно рішення Голоvbіопрому перед Херсонською біологічною фабрикою була поставлена задача освоїти, виготовити та випустити 2000 л алергену-бруцеліну. Разом з автором, старшим науковим співробітником ВІЕВ Касьяновим А. М. в березні місяці було виготовлено 4 серії алергену загальним літражем 637 л. При виготовленні «Бруцеліну» використовували виробничий штам *Brucella abortus* В1, отриманий з ВДНКІ. В цьому ж році Голоvbіопромом була запланована тема «Упровадження в виробництво технологічного виготовлення єдиного стандартного антигену для РА, РЗК, РДЗК». Разом зі співробітниками ВДНКІ Михайловим М. А. та співробітників ВНІТІБП Сапегіной О. П. проводилась робота по виготовленню єдиного стандартного антигену на щільному поживному середовищі МППБХ, були використані 2 виробничі штами *Brucella abortus* 19 та *Brucella abortus* К-03-19.

Виготовлення «Антигену бруцельозного для Роз-Бенгал проби (РБП) почалося набагато пізніше, вже в 80-х роках минулого століття.

Протягом значного періоду часу продукцію ДПХБФ використовували не лише лабораторії України, а і всього колишнього СРСР. Високий рівень якості вказаних препаратів підтверджено контролюючими організаціями та зростаючим попитом на внутрішньому та міжнародному ринках.

За період з 2008 року по 2011 рік ДПХБФ було виготовлено великий об'єм засобів діагностики бруцельозу:

Назва препарату	Кількість серій	Кількість виготовленого препарату
Антиген бруцельозний для Роз-Бенгал проби (РБП)	11	579,45л
Антиген бруцельозний єдиний для РА,РЗК	4	365,03
Антиген бруцельозний для кільцевої реакції (КР) з молоком	3	66,28л
БРУЦЕЛІН	2	94,5л

У процесі використання засобів, проведення наукових досліджень та аналізу отриманих результатів щодо вказаних виробничих штамів накопичився значний об'єм наукової інформації щодо показників активності, стабільності та умов зберігання штамів мікроорганізмів роду *Brucella*.

Мета: перевірка властивостей виробничих штамів *Brucella abortus* 19, *Brucella abortus* В1 *Brucella abortus* 104 М на відповідність паспортним характеристикам, нормативній документації та поглиблений науковий опис у відповідності до міжнародних вимог [1,2,3,4].

Матеріали і методи дослідження. Для дослідження паспортних характеристик були взяті виробничі штами *Brucella abortus* 104 М, *Brucella abortus* 19, які ліофілізовано в 2009 році та *Brucella abortus* В1, 1980 року ліофілізації. Дослідження проведено за показникам культурально-морфологічні характеристики, біохімічна активність, серологічні характеристики, життєздатність.

Перевірку ростових властивості штамів проводили за такою схемою: у флакон з ліофілізованим зразком штаму *Brucella abortus* 104 М вносили 2см фізрозчину, по стандарту мутності доводили до концентрації 2 млн/см³, робили десятикратні розведення від 10⁻¹ до 10⁻⁶. Розведення 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ висівали на чашки Петрі з МППА (на основі перевару Хотінгера) та культивували їх за температури 37°C.

Показника дисоціації досліджено методом Уайт-Вільсона:

чотири-добову культуру на чашках з агаром (де вирости окремі колонії), заливали розведеним основним розчином по Уайт-Вільсону, через 5 хвилин фарбу зливали і продивлялись колонії під малим збільшенням мікроскопу.

Реакція з акріфлавіном: акріфлавін в розведенні 1:1000 і фізрозчин, наносили на знежирене предметне скло, додавали і ретельно перемішували бактеріологічною петлею дводобову культуру штаму.

Реакція термоаглютинації: з дводобової агарової культури штаму готували завис $1,6 \times 10^9$ бруцел у фізрозчині, що відповідає 10 одиницям стандарту оптичного мікробіологічного, розливали у дві пробірки по 10 см^3 і прогрівали на водяній бані за температури 90°C 45 хвилин. Реакцію враховували через 1 годину після прогрівання.

Проба на сірководень: на скошений агар бактеріологічною петлею робили висів 48-годинного 2 млрд. завису культури штаму мікроорганізмів. Реактивом на сірководень є насичений водний розчин оцтовокислого свинцю, яким просочують, а потім висушують на повітрі смужки фільтрувального паперу розміром приблизно $1 \times 8 \text{ см}$. Культивування проводили у термостаті за температури 37°C . Результати показника утворення сірководню (потемніння нижнього краю папірця, що зависає над висівом) враховували тричі через кожні 1-2 дні. При кожному врахуванні папірець, що потемнів, замінювали на новий.

Результати власних досліджень. В результаті обліку життєздатності і ростової активності штамів мікроорганізмів встановлено, що через 4 доби на твердому середовищі *Brucella abortus* 104 М та *Brucella abortus* 19 утворили круглі, випуклі, правильного контуру, гладенькі, прозорі з блакитним відтінком з рівними краями колонії.

Дослідження дисоціації методом Уайт-Вільсона штамів *Brucella abortus* 104 М та *Brucella abortus* 19 показало відсутність дисоціації: гладенькі (недисоційовані) колонії залишилися не пофарбованими, округлими, блискучими, жовтувато-зеленуватого кольору, із чітким тонким контуром фіолетового кольору.

Ріст *Brucella abortus* В1 2009 року ліофілізації спостерігався як ріст дисоційованої культури, колонії пофарбувалися з відтінком синього, червоного, фіолетового кольорів, на поверхні окремих колоній видно окресленість.

Реакція з акріфлавіном досліджуваних штамів мікроорганізмів показала, що недисоційовані клітини штаму *Brucella abortus* 104 М та *Brucella abortus* 19 залишилися рівномірно розміщеними в краплі акріфлавіну, що свідчить про відсутність дисоціації штаму.

Дисоційовані клітини *Brucella abortus* В1 1980 року пофарбувалися з відтінком синього, червоного, фіолетового кольорів, на поверхні окремих колоній видно окресленість. Клітини штаму *Brucella abortus* В-1 через 1 хвилину склеїлися в грудочки, утворюючи пластівці. Культура випала в осад, культуральна рідина поступово просвітлилася. В результаті обліку

реакції термоаглоїтинації встановлено, що недисоційовані культури штамів *Brucella abortus* 104 М та *Brucella abortus* 19 залишилися гомогенними, непрозорими, з невеликими пластівцями бруцел. Дисоційована культура штаму *Brucella abortus* В-1 випала в осад, рідина поступово просвітлилася.

При дослідженні на сірководень встановлено, що *Brucella abortus* 104 М викликає потемніння паперців: 1 день - на 4, 6, 7 мм, 3 день – на 3, 5, 7 мм, 6 день – на 5, 6, 6, мм. Показник 3-разових вимірювань за 6 днів складає в середньому 5 мм. *Brucella abortus* – 19 потемніння папірців: 1 день – на 3, 4, 4 мм, 3 день – на 3, 6, 7мм, 6 день – на 5, 6, 7, мм. Показник 3-разових врахувань за 6 днів складає 5 мм. *Brucella abortus* В-1 потемніння папірців склало в середньому 5 мм

За рекомендаціями МЕБ морфологію колоній мікроорганізмів роду *Brucella* вивчають з використанням методу фарбування за Грамом або за Стемпом, визначення морфологічних показників проводять за методом Генрі за допомогою непрямовідбитого світла, акрифлавінового тесту, описаного Брауном та Вілсоном.

Біохімічну активність визначають з використанням уреазного, оксидазного та каталазного тестів. Реакцію аглоїтинації проводять з використанням анти-*Brucella* поліклональною сироваткою. Ідентифікацію видів та біоварів проводять фаготипуванням та реакції аглоїтинації з А-, М-, R - специфічними сироватками. Додатковими характерними реакціями є виділення сірководню, ріст в присутності основного фуксину та тіоніну в кінцевих концентраціях 20 мкг/г .

Рекомендованими методами зберігання виробничих штамів роду *Brucella* є серійне виготовлення посівного матеріалу та його ліофілізація або заморожування за температури рідкого азоту.

При паспортизації виробничих штамів розробниками діагностичних препаратів визначено періодичність пасажування їх на сприйнятливих тваринах. Ці умови забезпечення високої ефективності виробничих штамів потрібно витримувати. І обов'язковою умовою сьогодення є молекулярно-генетична характеристика штамів мікроорганізмів.

У колекції ДНКІБШМ депонуються діагностичні і вакцинні штами *Brucella abortus* , *Brucella ovis* вітчизняних виробників ВІЗ. Разом вони могли б створити повноцінне забезпечення системи діагностики, профілактики і лікування бруцельозу інноваційними продуктами.

Висновки:

1. Досліджені штами *Brucella abortus* 104 М, *Brucella abortus* 19, які було ліофілізовано 2009 року та *Brucella abortus* В1 1980 року ліофілізації відповідають паспортним характеристикам.

2. Встановлено, що в ліофільному стані при зберіганні в умовах морозильної камери (-20°C) штами зберігають життєздатність протягом 30 років.

Список використаних джерел:

1. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней : метод. рекомендации : МУК 4.2.3010-12. [Электронный ресурс] : утв. рук. Федер. службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Гл. гос. сан. врачом РФ Г. Г. Онищенко 29.03.2012 : введ. действие с 29.03.2012. – Способ доступа : <http://docs.cntd.ru/document/1200096183>

2. Иммунобиологические свойства вакцинных штаммов *Brucella abortus* [Текст] / А. В. Иванов и др. // Ветеринария. – 2009. – № 3. – С. 27-29.

3. Сидоров М. А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов / М. А. Сидоров, Д. И. Скородумов, В. Б. Федоров. – Москва : Колос, 1995. – С. 179-184.

4.. Bovine Brucellosis. Chapter 2.3.1. [Text] // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees) : fifts Edition, 2004. Vol. 1. – Paris : OIE, 2004. – P. 409-438.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ СЫРЬЕВОЙ БАЗЫ ПРОИЗВОДСТА ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА/ Акименко Л. И., Кошельник В. Г., Терпецкая Т. О., Нахабин В. М., Калугина Л. М.

*Проведена проверка свойств штаммов микроорганизмов *Brucella abortus* 19, *Brucella abortus* B1, *Brucella abortus* 104 М на соответствие паспортным характеристикам. Указанные штаммы микроорганизмов являются сырьевой базой для производства Государственным предприятием Херсонская биологическая фабрика (ГПХБФ) диагностических препаратов. В результате проверки установлено соответствие свойств производственных штаммов паспортным характеристикам, определены новые показатели активности, стабильности и условий хранения микроорганизмов. В соответствии с международными требованиями прописаны стандартные операционные процедуры (СОП) для закладывания образцов штаммов микроорганизмов на долгосрочное хранение.*

Ключевые слова: диагностические препараты, производственные штаммы микроорганизмов.

PROVISION WITH SOURCE OF MATERIALS FOR BRUCELLA DIAGNOSTIC PREPARATION PRODUCTION/ Akymenko L.,Koshelnik V., Terpetska T., Nahabin V., Kalugina L.

Verification of properties of strain of microorganisms of Brucella abortus 19, Brucella abortus Bl, Brucella abortus 104 M is conducted on accordance to passport descriptions. The indicated strain of microorganisms are the source of raw materials for a production the State enterprise the Kherson biological factory (SEKBF) of such preparations. As a result of verification accordance of properties of productive strain is set to passport descriptions, the new indexes of activity, stability and terms of storage of microorganisms strain are certain. In accordance with international requirements standard operating procedures (SOP) are prescribed for gobbing of standards of strains of microorganisms on long-term storage.

Key words - diagnostic preparations, strains of microorganism.

Рецензент – кандидат ветеринарних наук Н. Г. Пінчук

Рукопис надійшов 24. 07.2013р.