УДК 619:616.981.51
РУБЛЕНКО І.О., кандидат ветеринарних наук, *Білоцерківський національний аграрний університет*
СКРИПНИК В.Г., доктор ветеринарних 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

У статті 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 детергенту 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 літературних даних [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].

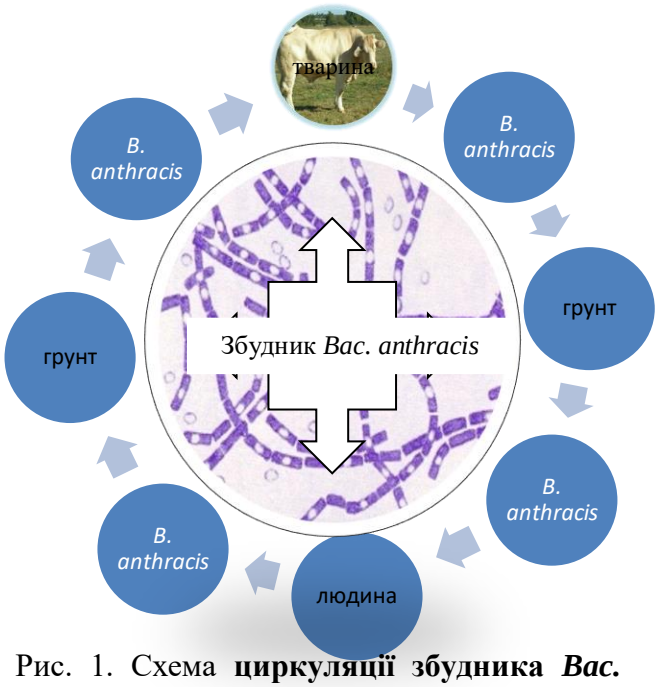

Рис. 1. Схема **циркуляції збудника *Bac. anthracis***

Окрім того, далеко не всім тваринам вчасно проводиться вакцинація [3,10], що створює умови для інфікування не вакцинованих тварин.

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

Нині на території Україні використовуються методика із методичних рекомендацій «Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды», (1989) [11] та методика затверджена 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 проводилися 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], «Evalution 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 $см^3$. Послідуючі дослідження проводили відповідно вище зазначених 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 ^oC протягом 24–48 год. Для отримання достовірних результатів ми провели 3 серії досліджень.

Результати досліджень та їх обговорення. Після культивування посівів, було виявлено незначну відмінність у кількості колоніє утворюючих 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 отриманих результатів досліджень, для виділення спор *Bacillus anthracis* із ґрунту, використовували середовища – МПА та PLET.

У зв'язку з тим, що методики №2 та № 3 дослідження ґрунту на наявність спор подібні, то ж і результати ми отримали ідентичні. Результати досліджень наведені у таблиці 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 у порівнянні з методикою №2, проте на 100 клітин менше – порівняно з методикою № 5 ($p<0,001$).

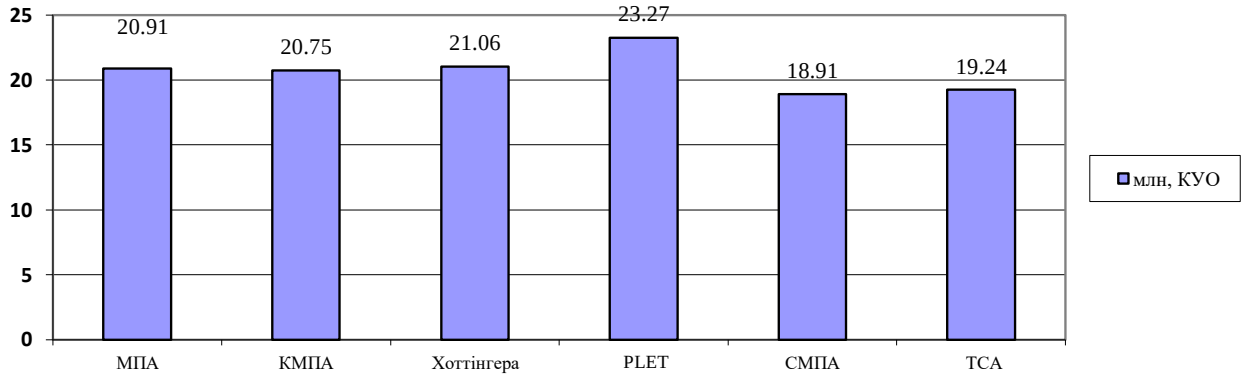

Рис. 2. **Кількість спор *Bac. anthracis*, що виросли на різних поживних середовищах, КУО**

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

Показники дослідження	№1	№№2-3	№4	№5	контроль
	ступінь розведення спор у МПБ				стерильний ґрунт 1:10–10^6
найбільший ступінь розведення, в якому виділено спори	1: 10^3, n=6	1:10^3, n=6	1:10^4, n=7	1:10^5, 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

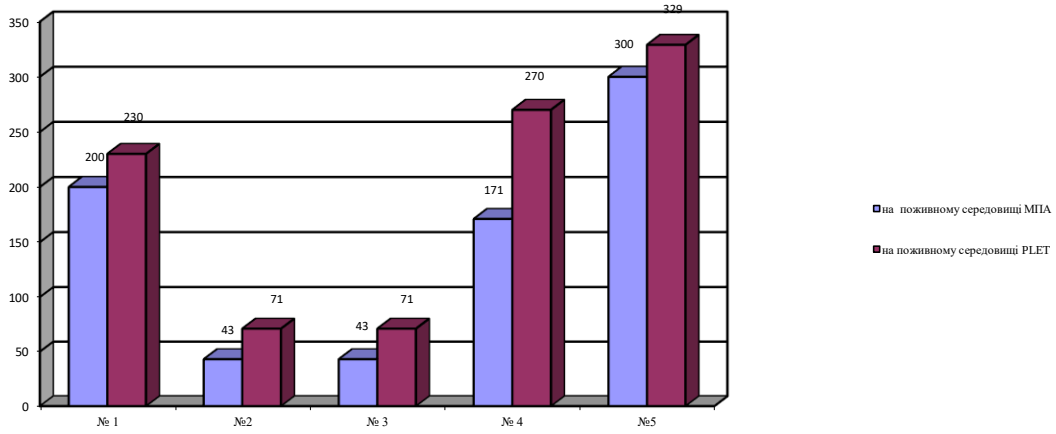

Рис. 3. – **Кількість клітин, що виділяється різними методиками, КУО**

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

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

Згідно методик №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 методики №5.

Кількість спор у 100 г ґрунту, при визначенні за методикою №4, становила 4181 КУО (при використанні середовища МПА). Тобто, за допомогою даної методики виділяється 4,09% КУО, що на 1,22 % більше у

порівнянні 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 (при внесенні 1673 спори 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 методикою №2, №3 і на 2508 – за методикою №4.

Слід відмітити, що дана методика (№5) більш ефективна, порівняно з іншими методиками, оскільки нею виявляються спори, при найменшій їх кількості у перерахунку на 100 г грунту.

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 даної методики для дослідження необхідно всього 2,5 г ґрунту, тоді як за методикою №1 – 60 г, за методикою №2 і №3 – 95, №4 – 10 г. Окрім того, методика №5 не потребує великих затрат часу і реактивів.

У перспективі подальших досліджень планується подальше 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. Бобильова О.О. 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 сибиреязвенных 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, V. Petrovic, M. Tomkovic [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 иммунологии. – 2010. – 35. – С. 62–66.

8. Caksen H. Cutaneous anthrax in eastern Turkey / H.Caksen, F.Arabaci M., Abuhandan, O.Tuncer, Y.Cesur // Cutis. – 2001. №67. – p. 488–492.

9. *Orou A., Fechner B., Utermann G., Menzel H. J.* Allelespecific competitive blocker PCR: a one-step method with applicability to pool screening // Hum. Mutat. – 1995. – 6, № 2. – P. 163–169.

10. Завірюха Г.М. Розробка нової технології виготовлення антигену сибіркового стандартного: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня кандидата сільськогосподарських наук: спец. 03.00.20 «біотехнологія» / Г.М. Завірюха. – Біла Церква. – 2002

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 довкілля: 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. Evalution 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). – e. 6532.

REFERENCES

1. Iovenko A. Vplyv gruntovoho faktora na roztashuvannya statsionarno neblahopoluchnykh punktiv na terytoriyi pivdennoho rehionu Ukrayiny / A. Iovenko // Vet. medytsyna Ukrayiny. – № 11. – 2004. – S. 12–14.

2. Bobyl'ova O.O. Sybirka v Ukrayini. Epidemiolohichnyy analiz za 55 rokiv (1946–2001) / O.O. Bobyl'ova, L.M. Mukhars'ka, L.S. Nekrasova, L.P. Nesterenko // Suchasni infektsiyi. – 2002. – №2. – S. 4–7.

3. Mumynov A.A. Heohrafycheskoe rasprostranenye y osnovnыe cherty эpyzootolohyy sybyrskoy yazvы v Tadzhykystane /A.A. Mumynov, D.S. Devryshov // Veterynarnaya medytsyna. – 2012 .– № 2. – S. 57–61.

4. Sharykov M.S. Эpyzootycheskyy potentsyal sybyreyazvennыkh zakhoronenyy v rayonakh Zakam'ya respublyky Tatarstan: avtoref. dys. na soyskanye uch. stepeny kandydata byol. nauk: spets. 16.00.03 «veterynarnaya mykrobyolohyya, vyrusolohyya, эpyzootolohyya, mykolohyya s mykotoksykolohyey y ymmunolohyya» / M.S. Sharykov. – Ufa, 2009. – 25 s.

5. Monsonov A.V. Mykrobyolohycheskyy monytorynh pochv zhyvotnыkh y skotomohyl'nykov na terrytoryy Zabaykal'skoho kraya: avtoref. dys. na soyskanye uch. stepeny kandydata vet. nauk: spets. 16.00.03 «veterynarnaya mykrobyolohyya, vyrusolohyya, эpyzootolohyya, mykolohyya s mykotoksykolohyey y ymmunolohyya» / A.V. Monsonov. – Ulan-Udэ, 2010. – 22 s.

6. Duric P. Three probable cases of cutaneous anthrax in autonomous province Vojvodina, Serbia / [P. Duric, G. Cosic, S. Rajcevic, V. Petrovic, M. Tomkovic [et al.] // J. Weekly issue. – 2012. – № 17. – P. 2–6.

7. Eremenko E.Y. Dyahnostyka sybyrskoy yazvы v Rossyyskoy federatsyy / E.Y. Eremenko, N.P. Buravtseva, A.N. Kulychenko, A.H. Ryazanova // Zhurnal mykrobyolohyy, эpydemyolohyy ymmunolohyy. – 2010. – 35. – S. 62–66.

8. Caksen H. Cutaneous anthrax in eastern Turkey / H.Caksen, F.Arabaci M., Abuhandan, O.Tuncer, Y.Cesur // Cutis. – 2001. №67. – p. 488–492.

9. Orou A., Fechner B., Utermann G., Menzel H. J. Allelespecific competitive blocker PCR: a one-step method with applicability to pool screening // 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's'kohospodars'kykh nauk: spets. 03.00.20 «biotekhnolohiya» / H.M. Zaviryukha. – Bila Tserkva. – 2002. – 18 s.

11. Laboratornaya diagnostika sibirskoi yazvi u jivotnih i lyudei_ obnarujenie vozbuditelya v sire jivotnogo proishojdeniya i obektah vneshnei sredi. Metodicheskie ukazaniya. Gosudarstvennii agropromishlennii komitet SSSR. M._ 1989. – 33 s.

12. Metodichni rekomendaciї z epidemiologiї ta profilaktiki sibirki u lyudei pro zahodi z profilaktiki zahvoryuvan na sibirku_ zatverdjena Ministerstvom Ohoroni zdorov'ya Ukraïni nakaz № 314 vid 09.07.2003r m. Kiïv.

13. Instruktsiyi z laboratornoyi diahnostyky sybirky u lyudey, v syrovyni tvarynnoho pokhodzhennya ta ob"yektakh dovkillya: Nakaz MOZ Ukrayiny vid 21.08.2002, № 321.

14. Ynstruktsyya 4.2.10–19–60–2005. Laboratornaya dyahnostyka sybyrskoy yazvы u lyudey y vыdelenye vozbudytelya sybyrskoy yazvы yz obъektov vneshney sredы: Postanovlenye Hlavnoho hosudarstvennoho sanytarnoho vracha Respublyky Belarus' ot 21 noyabrya 2005, № 181.

15. Laboratornaya dyahnostyka y obnaruzhenye vozbudytelya sybyrskoy yazvы. Metodycheskye ukazanyya. MUK 4.2.2413–08: Utverzhdeno Rukovodytelem Federal'noy sluzhbы po nadzoru v sfere zashchytы prav potrebyteley y blahopoluchyya cheloveka, Hlavnым hosudarstvennым sanytarnым vrachom Rossyyskoy Federatsyy H.H. Onyshchenko ot 29 yyulya 2008.

16. Dragon D.C. Evalution 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). – e. 6532.

Совершенствование бактериологического исследования почвы на наличие спор сибирской язвы

И.А. Рубленко, В.Г. Скрипник, В.О. Мачуський

В статье 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 Х-100, фильтрованного 1% бычьего сывороточного альбумина в 0,01 моль/мл фосфатно-солевом буфере, что позволяет выделить значительно большее (за методикою №5 на питательной среде PLET выделяется 19,66% клеток с внесенных, а за методиками №1, 2 (3), 4 – 3,3, 1,61 и 6,46 %) количество спор из почвы, чем методика описана в "Инструкции по лабораторной диагностики сибирской язвы у людей, в сырье животного происхождения и объектах окружающей среды ".

Ключевые слова: сибирская язва, выделения, споры, почва, культивирования.

SUMARIES

Improvement of the methods of bacteriological research of the soil on existence 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 sing methods № 1 the number of spores внесених 100 g soil was highest (6969±9,46), compared to techniques according № 2–5. However, using the methodology № 1, when using the nutrient medium

MPA, with concentration 6969 spores in the soil mass 100 g 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 PLEET 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 on 221 units more compared with the method № 4, and on 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 on 1,22% more, compared with the data obtained in the first method and on 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 on 2729 – with the method № 2, and on 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 slightest their 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.

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