

М.А.Рузимуродов, Р.А.Исмазова, Б.Х.Кувватов,
А.Д.Улугмуродов, Научно-исследовательский
ветеринарный институт

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ЭТАЛОНОВ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ БРУЦЕЛЛ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ПРОТИВОБРУЦЕЛЛЁЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Аннотация

Мацолада бруцеллёзга қарши ва референс препаратларни тайёрлаш учун керак бўлган ишлаб чиқариш штаммларнинг депозитариясини яратишда бруцелла культураларнинг хусусиятини ўрганиш билан боғлиқ муаммолар ёритилган.

Ключевые слова: штамм, диагностика, агглютинабельность, агглютиногенность, вирулентность, стабильность.

Для обеспечения животноводства страны высокими качественными биопрепаратами необходимо развивать собственное производство. Это отражено и в ПКМ № 24 от 12 января 2018 года «О мерах по созданию эффективных механизмов внедрения научно-инновационных разработок и технологий в производство», ПКМ №564 от 23 июля 2018 года «О мерах по дальнейшему развитию производства ветеринарных лекарственных средств», и др. исходящие из Постановлений Президента Республики Узбекистан № 1111-3026 от 1 июня 2017 года, № 1111-3874 от 19 июля 2018 года.

Качество иммунобиологических препаратов и быстрота их внедрения в производство напрямую зависят от наличия производственных и контрольных штаммов микроорганизмов, а также знаний разработчиками требований, предъявляемых к этим штаммам. Поэтому одной из основных задач развития производства в любой стране является создание в первую очередь собственной коллекции производственных штаммов, тщательное изучение их стабильности и всех присущих им генетических признаков (маркёров), биобезопасности, персистенции их в организме животных, взаимодействия между макро и микроорганизмами.

Основными маркёрами при характеристике вирулентных и авирулентных штаммов бруцелл являются агглютиногенность и агглютинабельность. Данные признаки маркёров являются основными при селекции штаммов бруцелл предназначенных для изготовления вакцин и диагностикумов. Важным является также и метод изготовления иммунобиологических препаратов. При этом нет необходимости подробно рассматривать всё многообразие маркёров характеризующих индивидуальность того или иного штамма. Необходимо знать основные признаки, такие как вирулентность (степень патогенности), способность размножаться на питательных средах (культурах клеток) т.е. урожайность, специфическую антигенную активность, степень

Summary

In the article there is touched upon the problematic issues related to the study of the properties of Brucella cultures, the need to create a depository of production stains for the manufacture of anti-brucella and reference preparation.

иммуногенности.

Еще одним требованием является то, что все производственные штаммы должны быть классифицированы, клонированы и представлять однородную популяцию микробов происходящих из одной клетки. Биологической закономерностью является наличие диссоциантов в потомстве даже одной клетки, при этом допускается присутствие диссоциированных клеток не более 5%. [1].

Вопросам изучения разработки и совершенствования средств и методов специфической профилактики и диагностики бруцеллёза посвящено множество работ (Здрадовский П. Ф., Вышелесский С.Н., Пашковский А.Н., Орлов Е.С., Вершилова П.А., Юсковец М.К., Иванов М.А, Косилов И.А., Шумилов К.В., Климанов А.И., Михайлов Н.А., Ниязов У.Э., Касьянов А.Н., Сапегина Е.П., Тавамайшвили М.Е., Иванов Н.П., Тен В.Б. и др.). Благодаря этим работам достигнуты значительные успехи в борьбе с бруцеллёзом, изучены и рекомендованы различные штаммы, и технологические процессы изготовления противобруцеллёзных препаратов многие из которых используются до сих пор.

Основной целью нашей работы являлось изучение свойств штаммов бруцелл различной видовой и вирулентной принадлежности выделенных в различных регионах нашей страны в разное время и создание отечественного депозитария производственных культур бруцелл и референс препаратов, которые могут быть использованы для изготовления противобруцеллёзных препаратов.

Материалы и методы

В работе использовали архивные материалы коллекции лаборатории бруцеллёза относительно 243 штаммов бруцелл различной видовой и вирулентной принадлежности, выделенных в период с 1950 по 2017 год на территории республики.

По результатам изучения были отобраны музейные штаммы Бр. абортус 104М, 19, Бр. мелитензис Рев-1, а также по 10 эпизоотических штаммов вида абортус и мелитензис.

В качестве питательной среды использовали Мясо-пептонный печёночный глюкозо-глицериновый агар (М1111ГГА) и Мясо-пептонный печёночный глюкозо-глицериновый бульон (М1111ГГБ). Инкубирование проводили в термостате с режимом работы 37-38°C в течении 48-72 часов.

Изучение культуральных, морфологических, биохимических, агглютинабельных, вирулентных и др. свойств местных эпизоотических культур бруцелл проводили в сравнении с референтными штаммами Бр. абортус-544 (Вейбридж), Бр. мелитензис Новочеркасск-102 (ВГНКИ) и Бр. suis 1330 (Вейбридж) в соответствии с методиками, рекомендованными ФАО/ВОЗ для работы с культурами бруцелл.

Принадлежность культур бруцелл того или иного вида изучалась по способности образования сероводорода (H₂S) с помощью уксуснокислого свинца. Тинкториальные свойства по чувствительности к основному фуксину и тионину при содержании её в различных концентрациях в питательной среде (1:25000, 1:50000, 1:100000). Вирулентные свойства изучаемых культур оценивались по росту и чувствительности к различным концентрациям пенициллина в питательной среде (0,5, 5, 10, 50 ЕД/мл) и эритролиту (1:1000). Стабильность, разновидность и степень диссоциации колоний эпизоотических культур бруцелл изучалась с помощью реакции термоагглютинации, использования акрифлавина, S, R положительных сывороток и метода Уайт-Вилсона с применением кристалвиолета в рабочем разведении 1:2000. Проведенные исследования позволили отобрать наиболее приемлемые штаммы для дальнейшего изучения их агглютинабельных и агглютинотных свойств.

Результаты исследований

Результаты исследований свойств 10 эпизоотических культур вида абортус и мелитензис в сравнении с референтными штаммами показали что несмотря на длительность пересевов и хранения все штаммы сохранили хорошие ростовые свойства, не имеют выраженных стойких признаков диссоциации и являются эпизоотически значимыми. Так в пробе с акрифлафином (1:1000), с R и S бруцеллёзными сыворотками (1:10), и методу Уайт-Вилсона обнаружены признаки диссоциации

в колониях первичных генераций, в дальнейшем в культурах 3-4 генерации эти признаки отсутствовали. Результаты изучения в тестах с пенициллином (0,5; 5; 10; 50 ЕД/ мл) показали что все отобранные культуры полевых штаммов не чувствительны к данному антибиотику при его концентрации в М1 1111 ГА 50 ЕД/мл. Тогда как Вакцинный штамм Бр. абортус 19 был чувствителен к концентрации 0,5 ЕД/мл, а штаммы Бр. абортус 104М и Бр мелитензис Рев-1 к концентрации 5 и 10 ЕД/мл. соответственно. Все культуры референтных штаммов (Бр. абортус 544, Бр. мелитензис Но- вочеркасск-102, и Бр. suis 1330) также были не чувствительны к пенициллину и хорошо росли при его содержании в М1111ГГА в концентрации 50 ЕД/мл. На среде с эритролитом (1:1000) все культуры изучаемых полевых штаммов хорошо росли в посевной дозе 100 мк. кл./мл. Референтные штаммы Бр. абортус 544, Бр. мелитензис Новочеркасск-102, и Бр. suis 1330 также были не чувствительны к эритролиту в дозе 100 мк.кл/мл т.е. наблюдали их бурный рост.

Вакцинные штаммы Бр. абортус 19, 104М и Бр мелитензис Рев-1 не росли на среде содержащей эритролит при посеве 100 мк.кл., но отмечали единичные колонии при посеве штамма Бр мелитензис Рев-1 дозе 1 млн. мк. кл. Что свидетельствует о более высокой ее вирулентности по сравнению с культурами вида Бр. абортус 19 и 104М. Таким образом несмотря на длительное хранение музейных, эпизоотических штаммов бруцелл на Mill 11 ГА и периодичность их пересевов на протяжении более 65 лет все они сохранили свои основные видовые и типовые культуральные морфологические, биохимические, вирулентные и другие свойства и остаются стабильными и эпизоотически значимыми.

Агглютинабельные свойства приготовленных антигенов из каждого штамма в отдельности изучали в классической реакции агглютинации до предельного титра. При этом установлено что титры выявляемых антигенов с антигенами из полевых штаммов были ниже чем титры в этих же сыворотках с антигенами из вакцинных штаммов бруцелл.

- Однако эта разница в титрах являлась статистически недостоверной. Агглютинат при использовании антигенов из эпизоотических штаммов отличался мелкозернистостью и легко разбивался что затрудняло учёт реакции. Результаты изучения свойств представлены в таблице.

Результаты агглютинабельных, вирулентных и биохимических свойства эпизоотических штаммов Br.abortus № 92, 126, 207, 1/2017UZ и Br. melitensis № 4, 9, 633 позволяют использовать их в качестве

Таблица. Результаты изучения свойств культур бруцелл

№ п/п	Наименование штамма	Харак. штамма	Прод. H ₂ S (см)	Рост на среде с красками	Рост на среде с пенициллином (Ед/мл)	Рост на среде с эритролом	Проба акриф. 1:1000	S-сыв	R-сыв	РА сыв. к.р.с (МЕ/мл)	РА сыв. м.р.с (МЕ/мл)
1	Бр.абортус-51; 92; 114;207;278; 337;338;604;26; 1/2017UZ	Эпиз.	>2,4	Фуксин 1:50000	>50	100 м.к.-един.кол. 1 млн.м.к. сплш.рост	отр.	отр.	пол.	50 -200	25-100
2	Бр.мелитензис-4; 30;193;9;81;653; 88;84;455;95	Эпиз.	-	Тианин 1:50000, Фуксин 1:50000	>50	100 м.к.-един.кол. 1 млн.м.к. сплш.рост	отр.	отр.	пол.	50-100	50-100
3	Бр.абортус 104М	Произ. авир.	-	Фуксин 1:50000	>5	-	отр.	отр.	пол.	100	50
4	Бр. абортус с 19	Муз. вак	>4	Фуксин 1:50000	>0,5	-	отр.	отр.	пол.	100	50
5	Бр. мелитензис Рев-1	Муз. вак	-	Фуксин 1:50000	10	-	отр.	отр.	пол.	100	50
6	Бр.абортус 544 (Вейбридж)	вирул.	>6	Фуксин 1:50000	>50	100 м.к.-един.кол 1 млн.м.к. сплш/р	отр.	отр.	пол.	200	200
7	Бр.суис 1330 (Вейбридж)	вирул.	>4	Фуксин 1:50000	>50	100 м.к.-един.кол 1 млн.м.к. сплш.рост	отр.	отр.	пол.	200	200
8	Бр.мелитензис Новочеркасск-102 (ВГНКИ)	вирул.	-	Фуксин 1:50000	>50	100 м.к.-един.кол. 1 млн.м.к. сплш.рост	отр.	отр.	пол.	100	100

отечественных референс препаратов вместо коммерческих референтных Бр. абортус-544 (Вейбридж), Бр. мелитензис Новочеркасск-102 (ВГНКИ).

Селекционированные в Узбекистане штаммы Бр.абортус 19 вариант UZ биотип-1, Бр.абортус 104М-вариант UZ биотип-6 и Бр. мелитензис Рев-1- вариант UZ биотип-1 из коллекции музея лаборатории бруцеллеза НИИВ не отличаются от своих аналогов коммерческих вакцинных штаммов по своим характеристикам, являются дженериками и могут быть использованы на территории республики для производства противобруцеллёзных вакцин и д-гностикумов.

Список используемой литературы:

ВЫВОДЫ

1. Установлено что несмотря на длительное хранение музейных, эпизоотических штаммов бруцелл на МЛ ПИТА и переодичность их пересевов на протяжении более 65 лет все они сохранили свои основные видовые и типовые свойства и остаются стабильными и эпизоотически значимыми.

3. Результаты изучения агглютинабельных, вирулентных и биохимических свойств эпизоотических штаммов Br.abortus № 92, 126, 207, 1/2017UZ и Br. melitensis № 4, 9, 633 позволяют использовать их в

1. Ветеринарные препараты // кн. под редакцией Д.Ф. Осидзе. - Москва: "Колос", 1981., 445 с.
2. Авилов В.М. Селиверстов В.В., Шумилов К.В. и др. «Бруцеллёз животных и его специфическая профилактика» // «Ветеринария», 1997. 7,-С. 3-6.
3. Косилов И.А. Бруцеллёз сельскохозяйственных животных. - Новосибирск, 1992. 260 с.
4. Шумилов К.В. и др. Специфическая профилактика бруцеллёза //Сб науч.тр. ВГНКИ. - Москва, 2000. -С. 160-163