

УДК 619:616.98-078:579.842.23:57.083.331:615.373.34

ВИВЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ТА СПЕЦИФІЧНОСТІ ПОЗИТИВНИХ ІЄРСИНІОЗНИХ СИРОВАТОК *YERSINIA ENTEROCOLITICA* СЕРОВАРИВ О:3, О:5, О:6.30, О:8, О:9

Обуховська О.В., Драгуть С.С., Чебанюк І.В., Рамазанова Т.П., Куценко В.А., Марченко Н.В.
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: olgaobukhovska@gmail.com

Кишковий ієрсиніоз – небезпечне захворювання сільськогосподарських тварин і людини, найбільший зооантропонозний потенціал мають *Yersinia enterocolitica* серовари О:3, О:5, О:6.30, О:8, О:9. З метою розробки ефективних вітчизняних засобів прижиттєвої діагностики ієрсиніозів проведено серію дослідів щодо отримання позитивних ієрсиніозних сироваток на кролях.

Проведено клонування 5-ти музейних штамів *Y. enterocolitica* з подальшим вивченням морфотинкторіальних, культуральних і біохімічних властивостей. Відібрано 5 клонів з типовими біологічними характеристиками з метою застосування їх у якості виробничих культур.

Застосована методика гіперімунізації кролів зростаючими дозами інактивованих суспензій ієрсиній. Показано, що використання цієї методики дозволяє виготовити активні та специфічні ієрсиніозні сироватки (титри 1:400–1:1600 в ПРА) щодо сероварів *Y. enterocolitica* О:3 О:6.30, О:8, О:9.

Встановлено, що запропонована технологія не дозволяє отримати високоспецифічну сироватку серовару *Y. enterocolitica* О:5, бо він має антигенну спорідненість із сероварами О:3 та О:6.30. Тому необхідно продовжити дослідження з метою вдосконалення цієї технології.

Ключові слова: кишковий ієрсиніоз, *Yersinia enterocolitica*, реакція аглютинації, позитивні сироватки.

Успішний розвиток тваринництва в сучасних умовах перш за все обумовлений благополучним епізоотичним станом окремих господарств і стад тварин. Кишкові інфекції залишаються однією з актуальних проблем ветеринарної медицини в багатьох країнах світу. До таких інфекцій відноситься і кишковий ієрсиніоз, що є зооантропонозом і спричиняється різними сероварами *Yersinia enterocolitica* [1, 2, 3, 4].

Значне розповсюдження збудників кишкових ієрсиніозів у нашій країні та за кордоном дає підставу стверджувати, що ця інфекція відіграє значну роль в патології тварин і людей [5, 6, 7]. В Україні ієрсиніозам сільськогосподарських тварин приділяється недостатньо уваги, тому вивчення біологічних, зокрема антигенних, властивостей *Y. enterocolitica*, має актуальне значення. А розробка вітчизняних препаратів для прижиттєвої діагностики цих захворювань є перспективним напрямком роботи фахівців ветеринарної медицини.

Мета роботи. Одержати мікросерії кролячих сироваток *Y. enterocolitica* сероварів О:3, О:5, О:6.30, О:8, О:9 та вивчити їх активність та специфічність в реакції аглютинації.

Матеріали та методи. Для виготовлення сироваток *Y. enterocolitica* сероварів О:3, О:5, О:6.30, О:8, О:9 були використані клінічно здорові кролі вагою 2,5 кг. Імунізацію кролів було проведено антигенами відповідних штамів. Для одержання антигенів культури ієрсиній висівали на МПА або агар Хоттінгера та вирощували за (26 ± 2) °С протягом 24 годин. Після перевірки на чистоту росту культури змивали стерильним фізрозчином, доводили концентрацію бактерій до 20 млрд. КУО/см³ за оптичним стандартом мутності та кип'ятили на водяній бані протягом 60 хв. Одержану суспензію охолоджували і центрифугували за 6000 об/хв. упродовж 20–25 хв. Осад відмивали стерильним фізрозчином з додержанням правил асептики. З нього готували суспензію бактерій в концентрації 2 млрд. КУО/см³, контролювали на повноту інактивації та стерильність.

Імунізацію проводили внутрішньовенно чотири рази з інтервалом 4 доби у зростаючій дозі (0,5 см³, 1,0 см³, 1,5 см³, 2,0 см³). Через 7 діб після останньої ін'єкції у кролів відбирали кров з вушної вени в об'ємі 1–2 см³ і сироватку досліджували у пробірковій реакції аглютинації з гомологічними і гетерологічними антигенами. При встановленні титру 1:400 і вище робили повне знекровлення кролів.

Сироватку консервували 5 % розчином фенолу, який малими порціями доливали у співвідношенні 1:10. Після відстоювання прозорий прошарок сироватки відбирали і фільтрували через стерилізуючий фільтр Зейтца та перевіряли на стерильність згідно ДСТУ 4483.

Для виготовлення негативної сироватки використовували клінічно здорових кролів вагою не менше 2,5–3,0 кг, сироватка крові яких при дослідженні в РА з антигенами *Y. enterocolitica* О:3, О:5, О:6.30, О:8, О:9 давала негативну реакцію.

Для отримання ієрсиніозних антигенів відібрані клони культур відсівали на МПБ та інкубували за (26 ± 2) °С. Одержані добові бульйонні культури перевіряли на чистоту фарбуванням мазків за Грамом. Чисті культури висівали на МПА та інкубували за температури (26 ± 2) °С протягом 48 годин. Після візуальної перевірки на чистоту росту культури змивали фізрозчином і стандартизували до концентрації 20 млрд. КУО/см³. Суспензії інактивували 0,4–0,5 % формаліном протягом 24 годин за температури 37 °С. Одержані антигени перевіряли на повноту інактивації за стандартними методиками. Стерильність одержаних антигенів визначали згідно з ДСТУ 4483.

Результати досліджень. У роботі були використані по дві мікросерії сироваток *Y. enterocolitica* О:3, О:5, О:6.30, О:9 та мікросерія сироватки *Y. enterocolitica* О:8, виготовлених за аналогічною схемою, але з різних клонів. Антигени ієрсиніозні зазначених сероварів були виготовлені з інактивованих суспензій виробничих клонів і стандартизовані до концентрації 20 млрд. КУО/см³.

Клонування музейних штамів *Y. enterocolitica* сероваріантів O:3, O:5, O:6.30, O:8, O:9 було проведено на МПА та МПБ упродовж п'яти послідовних пасажів. З кожного штаму було отримано по 3 клони. У отриманих клонів були вивчені морфологічно-тинкторіальні властивості шляхом мікроскопії мазків (фарбування за Грамом), культуральні та біохімічні властивості.

У ході дослідження спостерігали й дисоціацію культур, які мали вигляд поліморфних клітин різної величини та характеризувалися ростом гетерологічних колоній на МПА. Із загальної кількості отриманих клонів були відібрані гомогенні культури, що мали однакові морфологічні ознаки: дрібні Г-палички (овоїди розміром 0,8–1,2×0,3–0,7 мкм); які через 48 годин у МПБ давали помірне помутніння, невеликий осад, а на МПА формували дрібні прозорі колонії однієї величини.

Клони вказаних штамів були висіяні на тверді та напіврідкі поживні середовища (МПА, агар Ендо, середовище Хотінгера, МПНРА, МПБ). Також були проведені висіви на середовища для перевірки таких властивостей як: окислення-ферментація глюкози, ферментація лактози, маніту, сорбіту, мальтози, рамнози, рафінози; визначення здатності утворювати індол і H₂S; наявність каталазної активності; здатність розщеплювати уреазу; здатність утворювати кислоту та газ на середовищах з вуглеводами; реакцію Фогес - Проскауера та з метиловим червоним; здатність до росту на цитратному агарі Сімонса та на ацетатному агарі.

Для подальшої роботи були відібрані по два робочих клони сероварів *Y. enterocolitica* O:3, O:5, O:6.30, O:9 та один клон O:8 з характерними для виду біохімічними властивостями. Так, усі клони окислювали та ферментували глюкозу; утилізували маніт, арабінозу, мальтозу, сахарозу; не ферментували рамнозу, лактозу, рафінозу; не утворювали H₂S та індол; давали позитивну реакцію з метиловим червоним і негативно реагували в реакції Фогес-Проскауера. Не утилізували ацетат, цитрат і сечовину. Не мали фенілаланіндезамінази та були каталазоактивними. Антигенні властивості робочих клонів штамів *Y. enterocolitica* визначали в РА на склі із моноспецифічними ієрсиніозними сироватками.

Усього було виготовлено 9 експериментальних мікросерій ієрсиніозних сироваток (по дві серії для сероварів O:3, O:5, O:6.30, O:9; одна серія серовару O:8) і 5 експериментальних серій ієрсиніозних антигенів сероварів O:3, O:5, O:6.30, O:8 та O:9. Антигени були виготовлені з інактивованих суспензій виробничих клонів ієрсиній та стандартизовані до концентрації 20 млрд. КУО/см³.

Активність та специфічність сироваток була перевірена із гомо- та гетерологічними антигенами (табл. 1–5).

Таблиця 1 – Активність та специфічність гіперімунної ієрсиніозної сироватки O:3 (мікросерія O:3/1)

№ з/п	Розведення сироватки	Ієрсиніозні антигени				
		O:3	O:5	O:6.30	O:8	O:9
1	1:100	#	#	-	-	-
2	1:200	#	±	-	-	-
3	1:400	#	-	-	-	-
4	1:800	#	-	-	-	-
5	1:1600	+++	-	-	-	-
6	1:3200	±	-	-	-	-
7	1:6400	-	-	-	-	-

Як видно з результатів таблиці 1 ієрсиніозна сироватка мікросерії O:3/1 не давала перехресних реакцій з антигенами O:6.30, O:8 та O:9, однак мала перехресні реакції із антигеном O:5 у титрі 1:100. Активність її була високою, реакцію на # виявляли в титрі 1:800.

Таблиця 2 – Активність та специфічність гіперімунної ієрсиніозної сироватки O:5 (мікросерія O:5/1)

№ з/п	Розведення сироватки	Ієрсиніозні антигени				
		O:3	O:5	O:6.30	O:8	O:9
1	1:100	#	#	#	-	-
2	1:200	#	#	#	-	-
3	1:400	++	#	++	-	-
4	1:800	-	#	-	-	-
5	1:1600	-	#	-	-	-
6	1:3200	-	++	-	-	-
7	1:6400	-	-	-	-	-

Ієрсиніозна сироватка мікросерії O:5/1 не давала перехресних реакцій з антигенами O:8 та O:9 (див. табл. 2), але мала перехресні реакції із антигенами O:3 та O:6.30 у титрах до 1:400. Активність її була високою, реакцію на # виявляли в титрі 1:1600.

Таблиця 3 – Активність та специфічність гіперімунної ієрсиніозної сироватки O:6.30 (мікросерія O:6.30/2)

№ з/п	Розведення сироватки	Ієрсиніозні антигени				
		O:3	O:5	O:6.30	O:8	O:9
1	1:100	-	++	#	-	-
2	1:200	-	-	#	-	-
3	1:400	-	-	#	-	-
4	1:600	-	-	#	-	-
5	1:800	-	-	#	-	-
6	1:3200	-	-	+++	-	-
7	1:6400	-	-	+	-	-

Специфічність сироватки мікросерії O:6.30/2 відображена в таблиці 3 – вона не давала перехресних реакцій з антигенами O:3, O:5, O:8 та O:9. Активність її була високою, реакцію на # виявляли в титрі 1:800.

Таблиця 4 – Активність та специфічність гіперімунної ієрсиніозної сироватки O:8 (мікросерія O:8/1)

№ з/п	Розведення сироватки	Ієрсиніозні антигени				
		O:3	O:5	O:6.30	O:8	O:9
1	1:100	-	-	-	#	-
2	1:200	-	-	-	#	-
3	1:400	-	-	-	#	-
4	1:600	-	-	-	+++	-
5	1:800	-	-	-	++	-
6	1:3200	-	-	-	++	-
7	1:6400	-	-	-	-	-

Перехресні реакції із антигенами O:3, O:5, O:6.30 та O:9 не були виявлені при контролюванні сироватки мікросерії O:8/1. Активність була середньою, реакцію на # виявляли в титрі 1:400 (табл. 4).

Таблиця 5 – Активність та специфічність гіперімунної ієрсиніозної сироватки O:9 (мікросерія O:9/2)

№ з/п	Розведення сироваток	Ієрсиніозні антигени				
		O:3	O:5	O:6.30	O:8	O:9
1	1:100	-	-	-	-	#
2	1:200	-	-	-	-	#
3	1:400	-	-	-	-	#
4	1:800	-	-	-	-	#
5	1:1600	-	-	-	-	#
6	1:3200	-	-	-	-	+++
7	1:6400	-	-	-	-	+

Найкращі результати були зареєстровані при перевірці мікросерії сироватки O:9/2, при цьому не було виявлено перехресних реакцій із антигенами O:3, O:5, O:6.30 та O:8. Активність сироватки була найвищою та дорівнювала # в титрі 1:1600 (див. табл. 5).

Таким чином, застосована нами технологія дозволяє отримати активні та специфічні сироватки з сероварів *Y. enterocolitica* O:3, O:6.30, O:8 та O:9. Щодо серовару *Y. enterocolitica* O:5, то за результатами наших попередніх досліджень було встановлено, що він має антигенну спорідненість із сероварами O:3 та O:6.30. Отримати специфічну ієрсиніозну сироватку O:5 на цьому етапі роботи ми не змогли. На цій підставі дослідження щодо відпрацювання цієї технології будуть продовжені в напрямку підвищення її специфічності.

Висновки. У процесі одержання та вивчення активності мікросерій кролячих ієрсиніозних сироваток відпрацьовано методику одержання компонентів набору, призначеного для серологічної діагностики ієрсиніозу тварин у РА.

Показано, що застосування цієї методики дозволяє виготовити активні та специфічні ієрсиніозні сироватки (титри 1:400–1:1600 в ПРА) щодо сероварів *Y. enterocolitica* O:3 O:6.30, O:8, O:9.

Встановлено, що запропонована технологія не дозволяє отримати високоспецифічну сироватку серовару *Y. enterocolitica* O:5, тому що він має антигенну спорідненість із сероварами O:3 та O:6.30. Тому необхідно продовжити дослідження з метою вдосконалення цієї технології.

Перспективи подальших досліджень. Розробка вітчизняного діагностичного набору для серологічної діагностики в РА ієрсиніозу тварин, спричиненого *Yersinia enterocolitica* сероварів O:3, O:5, O:6.30, O:8, O:9.

Список літератури

1. Detection and prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in refrigerated and frozen dairy products by duplex PCR and dot hybridization targeting the *virF* and *ail* genes [Text] / Y.W. Ye [et al.] // J. Dairy Sci. – 2014. – Vol. 97 (11). – P. 6785-6791.
2. Phenotypic and genotypic analysis of bio-serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various sources in Brazil [Text] / L.A. Rusak [et al.] // J. Infect. Dev. Ctries. – 2014. – Vol. 8 (12). – P. 1533-1540.3.
3. Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments [Text] / C.M. McAuley [et al.] // J. Dairy Sci. – 2014. – Vol. 97 (12). – P. 7402-7412.
4. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Yersinia* species and *Yersinia enterocolitica* isolated from raw milk in farm bulk tanks [Text] / h. Jamali [et al.] // J. Dairy Sci. – 2015. – Vol. 98 (2). – P. 798-80:3.
5. Relation between serology of meat juice and bacteriology of tonsils and feces for the detection of enteropathogenic *Yersinia* spp. in pigs at slaughter [Text] / I. Van Damme [et al.] // Foodborn Pathog. Dis. – 2014. – Vol. 11 (8). – P. 596-601.
6. Valentin-Weigand, P. Unique virulence properties of *Yersinia enterocolitica* O:3 - an emerging zoonotic pathogen using pigs as preferred reservoir host [Text] / P. Valentin-Weigand, J. Heesemann, P. Dersh // Int. J. Med. Microbiol. – 2014. – Vol. 304 (7). – P. 824-834.
7. Zdolec, N. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in/on tonsils and mandibular lymph nodes of slaughtered pigs [Text] / N. Zdolec, V. Dobranic, I. Filipovic // Folia Microbiol. – 2015. – Vol. 60 (2). – P. 131-135.

STUDY OF ACTIVITY AND SPECIFICITY OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* SEROVARS O:3, O:5, O:6.30, O:8, O:9 POSITIVE SERA

Obukhovska O.V., Dragut S.S., Chebanuk I.V., Ramazanova T.P., Kutzenko V.A., Marchenko N.V.
National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov, Ukraine

*Intestinal Yersiniosis is a dangerous disease of livestock and humans, *Yersinia enterocolitica* serovars O: 3, O: 5, O: 6.30, O: 8, O: 9 have the greatest antropontic potential. The series of experiments for positive *Yersinia* sera obtaining in rabbits was performed in order to develop of effective domestic products for in vivo diagnosis of Yersiniosis.*

*5 museum strains of *Y. enterocolitica* have been cloned with the study of morphological, tinctorial, cultural and biochemical properties. 5 clones with typical biological characteristics were selected in order to use them as industrial cultures.*

*The rabbits hyperimmunization technique with increasing doses of inactivated *Yersinia* suspensions was used. It is shown that the use of this technique allows you to get active and specific sera (titers 1: 400–1: 1600) for *Y. enterocolitica* serovars O:3, O:6.30, O:8, O:9.*

*It is found that the proposed technology does not allow to obtain highly specific serum for *Y. enterocolitica* serovar O:5, because it has an antigenic affinity to serovars O:3 and O:6.30. Therefore it is necessary to continue research to improve this technology.*

Keywords: Intestinal Yersiniosis, *Yersinia enterocolitica*, serum agglutination test, positive sera.