

and indicated that the anthroponotic foci of zoonotic chlamydiosis was active. In the studied area of south of Ukraine the long-term functioning natural foci of tularemia in Genichesk district, Kherson region (island Biruchiy) and Chilia district of Odessa region (Danube delta) was registered. In some habitats there was identified mixed poly-infection natural foci (psittacosis, tularemia, leptospirosis, arboviral infections), which required poly-zoological approach to their monitoring.

Conclusions. The comprehensive ecological and epidemiological studies in the south of Ukraine have revealed high prevalence of zoonosis (psittacosis, tularemia, leptospirosis, arboviral infections) among birds, animals and people. A set of evidence-based recommendations for improving of the system of prevention of especially dangerous infections of various etiologies natural foci activation was made.

Keywords: zoonosis, natural foci, human, birds, mammals, diagnosis, prevention.

УДК 619: 576.8.078:616.981.42

ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ БРУЦЕЛ ТА ЕНТЕРОБАКТЕРІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛР У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

Обуховська О.В., Орлов С.М., Герілович А.П., Горайчук І.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: olgaobukhovska@gmail.com

Особливо небезпечним інфекційним захворюванням ссавців є бруцельоз, що спричиняється бактеріями роду *Brucella*. На сьогодні відомо 10 видів бруцел, але найбільший антропозоонозний потенціал мають види *B. melitensis*, *B. abortus* і *B. suis*. Для діагностики бруцельозу у ветеринарній практиці використовують великий перелік методів, але вони трудомісткі та тривалі. Застосування ПЛР на ранніх етапах досліджень може значно прискорити процес постановки діагнозу.

Метою наших досліджень було виявлення мінімальної кількості праймерів, що дозволяють здійснювати диференціацію бруцел від ентеробактерій в нативних суспензіях та пробах біологічного матеріалу.

У досліджах була вивчена можливість виявлення ДНК бруцел видів *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella ovis* та ентеробактерій, з якими вони мають антигенну спорідненість за ліпополісахаридними антигенами, в інактивованих суспензіях та пробах молока і сироватці крові.

У досліджах використовували інактивовані суспензії штамів бруцел (*B. abortus* 544, 19-770; *B. suis* 1330; *B. ovis* 67/Б, 76/982) та ентеробактерій (*Y. enterocolitica* 09, *E. coli* 099, *S. Enteritidis* М), а також проби сироваток крові та молока, контаміновані живими суспензіями зазначених культур. В якості негативних контролей застосовували: стерильні проби сироваток крові та молока; стерильний фізрозчин.

Ізоляцію сумарної ДНК проводили за допомогою комерційного набору для екстракції ДНК «ДНК-сорб-В». Ампліфікацію зразків здійснювали за допомогою набору «АмпліСенс». Основні дослідження проводили відповідно до лабораторного регламенту виявлення бруцел методом ПЛР.

Встановлено, що для диференціації у пробах біологічного матеріалу бруцел видів *B. abortus*, *B. suis* та *B. ovis* від ентеробактерій видів *Y. enterocolitica*, *S. enteritidis* та *E. coli* доцільно застосовувати видові праймери бруцел, які відповідають ділянкам 152 п.н., 450 п.н., 587 п.н.

Ключові слова: *Brucella*, *Enterobacteria*, диференційна діагностика, ПЛР.

Особливо небезпечним інфекційним захворюванням ссавців є бруцельоз, що спричиняється бактеріями роду *Brucella*. На сьогодні відомо 10 видів бруцел, але найбільший антропозоонозний потенціал мають види *B. melitensis*, *B. abortus* і *B. suis*. У багатьох регіонах світу епізоотична ситуація щодо бруцельозу тварин є загрозливою та нестабільною. Україна є благополучною щодо бруцельозу тварин, однак на сьогодні існують ризики занесення бруцельозу тварин з неблагополучних щодо цієї інфекції країн (зокрема, Російської Федерації, Туреччини, Сербії, Грузії, Вірменії, Азербайджану, Китаю) під час експортно-імпортних операцій або міграції представників дикої фауни [1, 2, 3, 4].

Для діагностики бруцельозу у ветеринарній практиці використовують клініко-епізоотологічні дослідження, серологічні тести (РБП, РА, КР, РЗК, РТЗК, РІД, ІФА), алергопробу, бактеріологічні дослідження (ізоляція та ідентифікація збудника) і біопробу на лабораторних тваринах [5, 6]. Усі перелічені методи вельми трудомісткі, вимагають значної кількості засобів і часу, крім того, деякі з них недостатньо специфічні, що вимагає проведення комплексних досліджень.

Впровадження нових швидких, специфічних і високочутливих методів діагностики бруцельозу є актуальним напрямком досліджень. Одним з таких є метод полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР), який вперше був застосований D. Fekete et al. (1990 р.) для детекції бруцел. Надалі окремі вчені повідомили про успішне використання даного методу для родової та видової ідентифікації цих мікроорганізмів. За літературними даними ПЛР проявила себе як високоспецифічний і чутливий метод лабораторної діагностики у разі гострого і хронічного перебігу бруцельозу у ВРХ та людей, який перевершує за чутливістю та специфічністю традиційні бактеріологічні і серологічні методи [7, 8, 9, 10].

Метою наших досліджень було виявлення мінімальної кількості праймерів, що дозволяють здійснювати диференціацію бруцел від ентеробактерій в нативних суспензіях і пробах біологічного матеріалу.

Матеріали та методи. У досліді були вивчені нуклеотидні послідовності бруцел видів *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella ovis* та ентеробактерій, з якими вони мають антигенну спорідненість за ліпополісахаридними антигенами.

В експерименті використовували:

- агарові культури штамів (кожного окремо) *Brucella abortus* 544, 19-770; *Brucella suis* 1330; *Brucella ovis* 67/Б, 76/982 і *Yersinia enterocolitica* 09, *Escherichia coli* 099, *Salmonella Enteritidis* М, були стандартизовані фізрозчином у концентрації від 10 КУО/см³ до 10⁹ КУО/см³ (з кроком розведення кратним десяти);
- стерильні проби сироватки крові та молока (по 0,3 см³), контаміновані шляхом внесення 0,1 см³ суспензій з концентрацією бактерій 10⁹ КУО/см³ (культур *B. abortus* 19, *B. suis* 1330, *B. ovis* 67/Б, *B. ovis* 76/982 і *Y. enterocolitica* 09, *E. coli* 099, *S. Enteritidis* М.).

В якості негативних контролей застосовували: інтактні проби крові; інтактні проби молока; стерильний фізрозчин.

Дводобові культури ентеробактерій і тридодобові агарові культури бруцел вищевказаних штамів змивали стерильним фізрозчином. Виготовляли суспензії, які стандартизували до концентрації 10⁹ КУО/см³, інактивували на водяній бані за температури 100 °С впродовж 30 хв. Зразки фасували в епіндорфи по 0,5 см³ і зберігали за температури мінус 20 °С.

В усіх пробах виявляли ДНК бруцел видів *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis* із застосуванням такої методики. Ізоляцію сумарної ДНК проводили за допомогою комерційного набору для екстракції ДНК «ДНК-сорб-В» виробництва «ЦНДІЕ» (РФ). Напрацьовані зразки ДНК використовували для постановки ампліфікації за допомогою базових наборів АмпліСенс (РФ) та системи праймерів із застосуванням переадаптованого методу постановки ампліфікації. Ампліфікацію зразків проводили за допомогою наборів «АмпліСенс», виробництва ФГУН «ЦНДІЕ РосСпоживНагляд» (РФ). Електрофоретичний аналіз проводили за допомогою набору для електрофорезу виробництва НВО Нарвак, РФ. Концентрація агарози в гелі становила 1,5 %, напруга в електрофоретичній камері – 120 В. Ампліфіковані фрагменти аналізованої ДНК виявляли у вигляді світлих жовтогарячих смужок при проходженні УФ- випромінювання з довжиною хвилі 310 нм. У негативному контрольному зразку смужки були відсутні.

Подальші дослідження проводили відповідно до лабораторного регламенту виявлення бруцел методом ПЛР.

Результати досліджень були задокументовані шляхом фотографуванням гелів з використанням комп'ютерних систем з цифровими відеокамерами.

Результати досліджень. У досліді виявлено культурально-морфологічні властивості та нуклеотидні послідовності 5 штамів бруцел (*B. abortus* 544 і 19, *B. suis* 1330, *B. ovis* 67/Б і 76/982) і 3-х штамів ентеробактерій (*Y. enterocolitica* 09, *E. coli* 099, *S. Enteritidis* М), з якими вони мають антигенну спорідненість за ліпополісахаридним антигеном. Були проведені дослідження в ПЛР, як бактеріальних суспензій зазначених культур, так і проб сироваток крові та молока, контамінованих цими культурами. Результати досліджень відображено на рис 1.

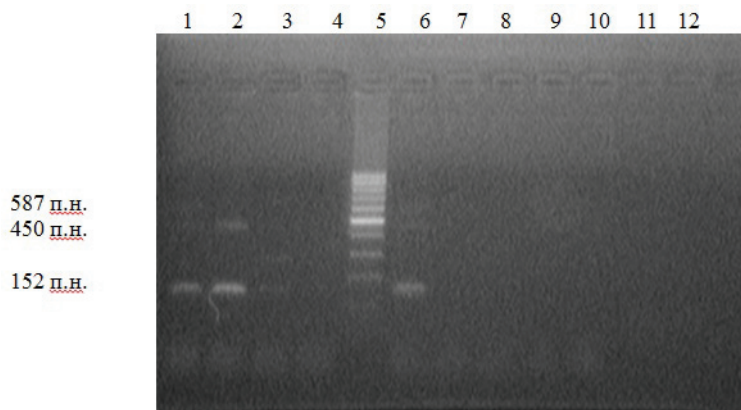


Рис. 1. Електрофореграма ПЛР проб біологічного матеріалу, контамінованих бруцелами та ентеробактеріями (1 – *B. abortus* 544 (сироватка крові); 2 – *B. abortus* 19-770 (молоко); 3 – *B. suis* 1330 (сироватка крові); 4 – *B. ovis* 67/Б (сироватка крові); 5 – маркер; 6 – *B. ovis* 76/982 (сироватка крові); 7 – *Y. enterocolitica* 09 (сироватка крові); 8 – *S. Enteritidis* М (сироватка крові); 9 – *E. coli* 099 (сироватка крові); 10 – негативний контроль; 11 – стерильна сироватка крові ВРХ; 12 – стерильне кров'яче молоко)

Встановлено, що за умов порівняльного дослідження в ПЛР суспензій агарових культур штамів бруцел та ентеробактерій із застосуванням видоспецифічних бруцельозних праймерів можливо віддеференціювати ці патогени. Так штами *B. abortus* показують наявність ділянок 152 п.н., 450 п.н. та 587 п.н., штами *B. suis* – наявність ділянок 152 п.н., 272 п.н. та штами *B. ovis* – наявність ділянок 152 п.н. та 450 п.н. відповідно. В ентеробактерій *Y. enterocolitica* 09, *S. Enteritidis* М та *E. coli* 099 цих ділянок не виявлено.

За умов дослідження проб біологічного матеріалу, контамінованих бруцелами та ентеробактеріями встановлена аналогічна тенденція. Проби сироватки крові та молока, контаміновані штамми *B. abortus* 544 та 19-770 показали наявність ділянок 152 п.н., 450 п.н. та 587 п.н., контаміновані штамом *B. suis* 1330 – наявність ділянок 152 п.н., 272 п.н. та контаміновані штамми *B. ovis* 67/Б та 76/982 – наявність ділянок 152 п.н. та 450 п.н. відповідно. Проби сироватки крові та молока, контаміновані штамми

Y. enterocolitica 09, *S. Enteritidis* M та *E. coli* 099, не мали цих ділянок. Негативні контролю – стерильне коров'яче молоко, стерильна сироватка крові та деіонізована вода показали чіткий негативний результат.

Таким чином, показано, що за умов наявності антигенної спорідненості штамів бруцел та ентеробактерій, яка може бути виявлена на рівні видоспецифічних ділянок ДНК, для диференціації у пробах біологічного матеріалу бруцел видів *B. abortus*, *B. suis* та *B. ovis* від ентеробактерій видів *Y. enterocolitica*, *S. Enteritidis* та *E. coli* доцільно застосовувати видові праймери бруцел, які відповідають ділянкам 152 п.н., 450 п.н., 587 п.н.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується розробити робочі видоспецифічні ДНК стандарти бруцел для ПЛР.

Висновки. Встановлено, що для диференціації бруцел видів *B. abortus*, *B. suis* та *B. ovis* від ентеробактерій видів *Y. enterocolitica*, *S. Enteritidis* та *E. coli* доцільно застосовувати видові праймери бруцел, які відповідають ділянкам 152 п.н., 450 п.н. та 587 п.н.

Запропонована нами методика дозволяє достовірно виявити наявність бруцел трьох видів у пробах біологічного матеріалу із застосуванням ПЛР та диференціювати їх від ентеробактерій.

Список літератури

1. Бусол, В.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных [Текст] / В.А. Бусол, А.Ф. Бабкин, П.Н. Жованик. – К.: Урожай, 1991. – 176 с.
2. Хасенов, Е.С. Совершенствование специальных мероприятий против бруцеллеза и туберкулеза крупного рогатого скота в новых условиях хозяйствования Костанайской области [Текст] / Е.С. Хасенов // Автореф. дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03 / ДГП «НИВИ» РГП «НПЦ ЖиВ». – Алматы. – 2006. – 53 с.
3. BOVINE BRUCELLOSIS. CHAPTER 2.3.1. //OIE Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines, 5th edition.– 2004 [Електронний ресурс].–Спосіб доступу: URL:http://oie.int/eng/normes/mmanual/A_00048.– Заголовок з екрана.
4. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis [Text] / J. Godfroid [et al.] // Vet. Res. – 2005. – Vol. 36, No. 3. – P. 313-326.
5. Інструкція про заходи з профілактики та боротьби з бруцельозом тварин [Текст] Затверджена Державним департаментом ветеринарної медицини Мінагропрому України № 4 від 25.01.2000. – Київ. – 20 с.
6. Настанова по діагностиці бруцельозу тварин [Текст] Затверджена Міністерством АПК України № 15-14/55 від 10.02.1998. – Київ. – 58 с.
7. Moreno, E., Cloeckaert A., Moriyon I. Brucella evolution and taxonomy [Text] / E. Moreno, A. Cloeckaert, I. Moriyon // Vet. Microbiol. – 2002. – Vol. 90. – P. 209-227.
8. Probable transmission of brucellosis by breast milk [Text] / I. Arroyo Carrera [et al.] // J. Trop. Pediatr. – 2006. – Vol. 52, No. 5. – P. 380-381.
9. Желудков, М.М. Метод ПЦР для идентификации и дифференциации бруцелл. [Текст] / М.М. Желудков, Ю.К. Кулаков, Т.А. Толмачева // Сб. Материалы IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – 2007. – М. – Ч.3. – С. 5.
10. World Animal Health Information Database (WAHID) Interface // OIE World Animal Health Information System.– 2006 [Електронний ресурс].– Спосіб доступу: URL: <http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?page=home>.– Заголовок з екрана.

DIFFERENTIATION OF BRUCELLA AND ENTEROBACTERIA BY PCR IN BIOLOGICAL FLUIDS

Obuhovska O.V., Orlov S.M., Gerilovych A.P., Goraichuk I.V.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov, Ukraine

Especially dangerous infectious disease of mammals is Brucellosis, which causes by bacteria of Brucella genus. Today it is known 10 species of Brucella, but most zoonotic potential have B. melitensis, B. abortus and B. suis. For the diagnosis of brucellosis in veterinary practice to use multiple methods, but they are all labor-intensive and time-consuming. The use of PCR in the early stages of research can significantly speed up the process of diagnosis.

The aim of our study was to determine the minimum number of primers that allow for differentiation of Brucella from Enterobacteria in native suspensions and samples of biological material.

Experiments were explored to identify for DNA of Brucella abortus, Brucella suis, Brucella ovis and Enterobacteria, with whom they share an affinity for the lipopolysaccharide antigens in the inactivated bacterial suspensions, samples of milk and blood serum.

In experiments using inactivated Brucella strains suspensions (B. abortus 544, 19-770; B. suis 1330; B. ovis 67 / B, 76/982) and Enterobacteriaceae (Y. enterocolitica 09, E. coli 099, S. Enteritidis M), and samples of blood serum and milk contaminated of live cultures Brucella and Enterobacteriaceae. As a negative control were using sterile samples of blood serum and milk; sterile saline.

DNA isolation was performed with commercial kit «DNA-sorb-B.» Amplification was performed with commercial kit «AmpliSens». Basic research was conducted in accordance with laboratory regulations for Brucella identify by PCR.

Research has established that the differentiation in samples of biological material Brucella species B. abortus, B. suis and B. ovis from Enterobacteriaceae species Y. enterocolitica, S. enteritidis and E. coli advisable to use specific primers Brucella, which correspond to sections 152 p.n ., 450 bp, 587 bp.

Keywords: *Brucella, Enterobacteria, differential diagnosis, PCR.*