

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШТАМІВ *BRUCELLA OVIS*, ВИДІЛЕНИХ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ УПРОДОВЖ 1973–2019 РОКІВ

Марченко Н. В., Лиманська О. Ю., Куценко В. А.,
Герілович А. П., Болотін В. І.

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

У статті представлено дані щодо біологічних властивостей штамів бруцел, які попередньо за біохімічними тестами були віднесені до виду *Brucella ovis*, та зберігалися в колекції мікроорганізмів ННЦ «ІЕКВМ». Установлено, що за тривалого зберігання штами не втратили своїх властивостей відповідно до паспортів. При цьому у чотирьох штамів (78/3131, 157/4151, 169/87, 68/Ж) відмічали ріст не тільки в присутності тіоніну, що є характерним для R-форм, а й у середовищі з фуксином (1:50 000 і 1:100 000). У результаті вивчення антигенних властивостей було встановлено, що зазначені штами мають бруцельозний S-антиген за відсутності R-антигена. Додатково під час проведення молекулярно-генетичного типування з'ясувалося, що зазначені чотири штами належать до інших видів бруцел

Ключові слова: інфекційний епідидиміт баранів, ПЛР

Серед небезпечних хвороб, що завдають значних економічних збитків вівчарству за рахунок втрати генетичного фонду високоцінних порід і зниження рівня відтворення поголів'я, інфекційний епідидиміт баранів (ІЕБ) поширений у багатьох країнах світу з розвинутим вівчарством. За даними Міжнародного епізоотичного бюро ІЕБ реєструється в країнах Америки, Європи, Австралії, Новій Зеландії та Південній Африці [1]. Захворювання перебігає клінічно або субклінічно протягом тривалого часу життя тварин з характерними ураженнями статевих органів у баранів (епідидиміти, орхіти) і плацентитами у вівцематок, що супроводжується безпліддям, абортами, перинатальною та постнатальною смертністю ягнят [2]. Збудником хвороби є грамнегативний поліморфний мікроорганізм, який відносять до слабовірулентних R-форм бруцел, що еволюційно адаптований до овець і характеризується вираженим тропізмом до придатків статевих залоз баранів-плідників [3]. *B. ovis* відноситься до бактерій, що повільно ростуть і досить складно виділяються з патологічного матеріалу. Для культивування збудника необхідно використовувати збагачені поживні середовища, на яких бруцели цього виду за виділення довгостроково (5–30 діб) ростуть в умовах підвищеного вмісту CO₂ (10–15 %) за температури 37 °С. Для диференціації та ідентифікації бруцел використовують комплекс ознак, що включає в себе, крім морфологічних і тинкторіальних властивостей, також здатність рости на середовищах у присутності деяких барвників (основний фуксин, тіонін, сафранін), виділяти сірководень, утворювати уреазу, фосфатазу, каталазу, оксидазу, аглютинуватися моноспецифічними сироватками. Особливістю мікроорганізму є те, що в пробі з тріпанфлавіном культура характеризується як стійка R-форма, яка не має А- і М-антигенів гладких бруцел (S-форма). Збудник не лізується бруцельозним Тб-фагом. Він також позбавлений поверхневого оболонкового S-антигена, типового для інших бруцел, але його О-антиген володіє імунологічною спорідненістю з О-антигенами бруцел інших видів. Перехресно реагує з *B. canis* та з шорсткими формами інших видів бруцел [1, 4, 5]. Не дивлячись на вивченість властивостей збудника, а також взаємовідносин з макроорганізмом в останні роки відмічають ускладнення епізоотичної ситуації з ІЕБ. Багато питань з епізоотології, діагностики та боротьби з бруцелаовісною інфекцією залишається все ще невизначеним, враховуючи дані про мінливість цього збудника. Тому вивчення біологічних та молекулярно-генетичних властивостей польових ізолятів *B. ovis*, циркулюючих у нинішній час на території України, є важливим у викорененні збудника [6]. В Україні ситуація з ІЕБ у різні роки була неоднаковою і залежала від соціально-економічних умов,

рівня діагностики, якості проведення відповідних протиепізоотичних заходів. Аналіз спостережень щодо перебігу захворювання свідчить про стаціонарність інфекції у 9 з 25 областей України. Інфекційний епідемії баранів реєструють у Херсонській, Харківській, Сумській, Дніпропетровській, Донецькій, Черкаській, Хмельницькій, Рівненській областях та АР Крим. Економічні збитки складаються з вартості вимушено забитих тварин (іноді високоцінних порід), зниження продуктивності, втрат від абортів, витрат на проведення карантинних та оздоровчих заходів. Згідно з сучасними нормативними та методичними документами для діагностики бруцелязованої інфекції у ветеринарній практиці використовують клініко-епізоотологічні обстеження, серологічні тести (РТЗК, РІД, ІФА) та бактеріологічні дослідження (ізоляція та ідентифікація збудника). Вивчення біологічних властивостей збудника, вдосконалення існуючих і пошук нових специфічних та високочутливих методів діагностики інфекційного епідемії баранів, є важливою складовою контролю епізоотичного процесу [7].

Метою роботи було вивчення епізоотичних і виробничих штамів бруцел, зокрема культурально-морфологічних, тінкторіальних, біохімічних, антигенних властивостей і молекулярно-генетичного профілю *B. ovis*, установлення їхніх відмінностей у порівнянні з референтним штамом.

Матеріали та методи. Для виконання досліджень було відібрано 30 штамів *B. ovis*, ізольованих на території України, що мають відмінні просторово-часові характеристики (табл. 1). Штами тривалий час підтримувалися на м'ясо-пептонному-глюкозо-гліцериновому агарі з 10 % сироватки ВРХ (МППГГАС). Шість штамів *B. ovis* відновлено з ліофільного стану. Як контроль використовували штами *B. ovis* 63/290 (ATCC 25840, наданий Dr. Claire Ponsart з референс-лабораторії бруцельозу, ANSES, Франція) та *B. abortus* 187/99 (VLA, Weybridge, UK) як R- та S-форми бруцел відповідно.

Згідно з архівними даними всі штами були виділені з патологічного матеріалу, відібраного від баранів, крім штаму 68/Ж, який було отримано з абортованого плоду від вівці. Деліофілізацію штамів проводили шляхом розчинення вмісту ампул у 1 см³ 0,85 %-го натрію хлориду (рН = 7,2) і висівали у пробірки з декстрозно-сироваточним агаром, МППГГАС і МППГГБ. Штами вирощували за температури 37 °С у умовах термостату впродовж п'яти діб.

Таблиця 1 — Перелік штамів *B. ovis*, використаних у дослідженнях

№ з. п.	Інв. № штаму	Рік виділення	Область	№ з. п.	Інв. № штаму	Рік виділення	Область
1	65/65939	1973	Дані відсутні	16	159/8406	1991	Дані відсутні
2	66/94	1973	Одеська	17	162/08337	1993	АР Крим
3	67/Б	1976	Одеська	18	166/13575	1993	Чернівецька
4	68/Ж	1974	Луганська	19	168/1807	1994	Одеська
5	71/10	1975	Луганська	20	169/87	1994	Харківська
6	74/139	1975	Луганська	21	175/1257	2002	Херсонська
7	76/982	1976	Одеська	22	178/00440	2009	Херсонська
8	78/3131	1976	Одеська	23	179/00441	2009	Херсонська
9	83/7315	1976	Харківська	24	181/6967	2010	Харківська
10	103/33479	1978	Одеська	25	182/Тайсон	2010	Харківська
11	154/8206	1990	Закарпатська	26	183/13206	2011	Харківська
12	155/8162	1991	Закарпатська	27	184/03785	2011	Харківська
13	156/7808	1991	Закарпатська	28	185/03377	2011	Харківська
14	157/4151	1991	Закарпатська	29	186/21116	2017	Хмельницька
15	158/04496	1991	Закарпатська	30	-/644	2019	Харківська

Перевірку чистоти росту культур проводили візуально та фарбуванням мазків за Козловським і Грамом. Продукцію сірководню виявляли за допомогою тест-смужок з оцтовокислим свинцем, розміщених у пробірках з висівами культур. Оксидазну активність штамів досліджували за допомогою тест-смужок «Окситест», Lachema. Уреаазну активність досліджували висівами культур на МПБ зі сечовиною. Фарбування колоній за Уайт-Вільсоном 5-добових культур здійснювали 0,05 %-м розчином кристалвіолету впродовж 30 с. Для виявлення здатності штамів рости в присутності анілінових фарб суспензії культур у

концентрації 10^9 КУО/см³ висівали бактеріологічною петлею на напіврідкий агар (НРА) з фуксином (1:50 000 та 1:100 000) та НРА з тіоніном (1:25 000, 1:50 000, 1:100 000). Облік росту проводили кожні 2 доби впродовж 6 діб. Для проведення реакції термоаглютинації бактеріальну масу дводобових культур змивали з агару стерильним фізрозчином (рН = 7,2) та стандартизували до концентрації 2×10^9 КУО/см³ за оптичним стандартом каламутності 10 МО. Завісі прогрівали на водяній бані за температури 90 °С упродовж 45 хв. Облік реакції проводили через 1 та 24 год. Пробу з трипафлавіном проводили шляхом емульгування бактеріологічною петлею дводобової агарової культури на предметних скельцях у краплі 0,2 %-го розчину трипафлавіну (1:500) на 0,85 %-му NaCl. Аглютинабельні властивості штамів *Brucella* досліджували у пластинчатій реакції аглютинації на предметних скельцях зі специфічними аглютинуючими S- та R-сироватками [1, 5].

Для проведення молекулярно-генетичних досліджень готували інактивовану панель зразків штамів: змиви агарових культур стерильним фізіологічним розчином були стандартизовані до концентрації 10^9 КУО/см³ (за стандартом каламутності 10 МО) та інактивовані прогріванням у твердотільному термостаті за температури 95 °С упродовж 15 хв. Отриманий матеріал перевіряли на повноту інактивації шляхом висіву суспензій на відповідні середовища (режим інкубації: 37 °С упродовж 10 діб). Перевірені суспензії центрифугували, надосадову рідину піддавали дослідженню в ПЛР. Для видової диференціації штамів проводили дослідження за Brucе-Ladder ПЛР, використовуючи протокол, рекомендований авторами [8].

Результати досліджень. Проведено аналіз складу колекції культур *B. ovis*, що знаходяться у лабораторії вивчення бруцельозу ННЦ «ІЕКВМ» з 1973 р. та які переважно виділяли на території Харківської, Одеської та Закарпатської областей. Загалом досліджено 24 штами, які зберігаються за температури 5 ± 1 °С на МППГГАС з періодичністю пересіву 1,5–2 місяці, а також вивчено життєздатність шести ліофілізованих штамів (68/Ж, 83/7315, 103/33479, 74/139, 66/94, 71/10), що зберігалися за температури $6 \pm 2,0$ °С понад 35 років. Після проведення деліофілізації встановлено наявність типового росту культур штамів 74/139, 83/7315 і 103/33479 на твердих і рідких поживних середовищах. Під час відновлювання штамів 66/94 і 71/10 спостерігали ріст сторонньої мікрофлори у першу добу інкубації, при цьому типових для бруцел колоній не виявляли. Також проведено роботу з клонування й очищення штаму 68/Ж.

Установлено, що через 48–72 год інкубації за температури $37 \pm 1,0$ °С у присутності 10 % CO₂ на ТСАС і МППГГАС усі штами формували круглі випуклі напівпрозорі колонії з маслянистим блиском. Під час перегляду під стереоскопічним мікроскопом колонії мали характерну дрібнозернисту шорстку структуру та сіро-блакитний колір у прохідному світлі. На МППГГБ штами росли у вигляді легкої опалесценції та осаду у вигляді пункту або аглютинату. У мазках 3-добових культур, пофарбованих за Козловським, Грамом, бактерії мали форму коків і дрібних паличок червоного кольору. 24 культури штамів *B. ovis* аглютинувалися у трипофлавіновій пробі та реакції термоаглютинації, не проявляли оксидазну й уреазну активність (табл. 2).

Таблиця 2 — Біохімічні та антигенні властивості досліджених штамів *B. ovis*

№ з. п.	Інв. № штаму	Продукція H ₂ S	Окситест	Уреаза	Трипофлавінова проба	Реакція термоаглютинації	Моноспецифічні сироватки	
							S	R
1	65/65939	–	–	–	+	+	–	+
2	67/Б	–	–	–	+	+	–	+
3	68/Ж	+	+	+	–	–	+	–
4	74/139	–	–	–	+	+	–	+
5	76/982	–	–	–	+	+	–	+
6	78/3131	–	+	+	–	–	+	–
7	83/7315	–	–	–	+	+	–	+
8	103/33479	–	–	–	+	+	–	+
9	154/8206	–	–	–	+	+	–	+
10	155/8162	–	–	–	+	+	–	+
11	156/7808	–	–	–	+	+	–	+

№ з. п.	Інв. № штаму	Продукція H ₂ S	Окситест	Уреаза	Трипо-флавінова проба	Реакція термоаглютинації	Моноспецифічні сироватки	
							S	R
12	157/4151	–	+	+	–	–	+	+
13	158/04496	–	–	–	+	+	–	+
14	159/8406	–	–	–	+	+	–	+
15	162/08337	–	–	–	+	+	–	+
16	166/13575	–	–	–	+	+	–	+
17	168/1807	–	–	–	+	+	–	+
18	169/87	–	+	+	+	+	+	+
19	175/1257	–	–	–	+	+	–	+
20	178/00440	–	–	–	+	+	–	+
21	179/00441	–	–	–	+	+	–	+
22	181/6967	–	–	–	+	+	–	+
23	182/Тайсон	–	–	–	+	+	–	+
24	183/13206	–	–	–	+	+	–	+
25	184/03785	–	–	–	+	+	–	+
26	185/03377	–	–	–	+	+	–	+
27	186/21116	–	–	–	+	+	–	+
28	–/644	–	–	–	+	+	–	+
29	63/290 (R-форма)	–	–	–	+	+	–	+
30	187/99 (S-форма)	+	+	+	–	–	+	–

Примітки: «+» — ріст; «–» — відсутність росту

Загалом за культурально-морфологічними властивостями зразки штамів, що підтримувались на твердих поживних середовищах, а також у ліофільному стані, не відрізнялися.

Колонії 27 штамів на чашках Петрі, пофарбовані за Уайт-Вільсоном, мали синьо-фіолетове забарвлення дрібних колоній і червоно-фіолетове — крупних, окрім штаму 68/Ж, колонії якого мали лимонно-жовтий центр із блакитно-фіолетовою периферією.

На НРА з тіоніном усі штами давали характерний ріст «за ходом уколу» та редукували колір середовища (з синього на жовто-зелений або жовтий). На НРА з фуксином росли 4 штами 78/3131, 157/4151, 169/87, 68/Ж (табл. 3) і контрольний штам *B. abortus* 187/99 (S-форма).

Таблиця 3 — Властивості штамів рости у присутності анілінових фарб

№ з. п.	Інв. № штаму	НРА основний фуксин		НРА тіонін		
		1:100 000	1:50 000	1:100 000	1:50 000	1:25 000
1	65/65939	–	–	#	–	–
2	67/Б	–	–	#	+++	–
3	68/Ж	+++	++	#	#	–
4	74/139	–	–	#	#	–
5	76/982	–	–	#	#	–
6	78/3131	+++	++	#	+++	–
7	83/7315	–	–	#	++	–
8	103/33479	–	–	#	++	–
9	154/8206	–	–	#	#	–
10	155/8162	–	–	#	#	–
11	156/7808	–	–	#	#	–
12	157/4151	+++	++	#	+++	–
13	158/04496	–	–	#	#	–
14	159/8406	–	–	#	#	–

Розділ 1. Проблеми біобезпеки та біозахисту. Емерджентні інфекції

№ з. п.	Інв. № штаму	НРА основний фуксин		НРА тіонін		
		1:100 000	1:50 000	1:100 000	1:50 000	1:25 000
15	162/08337	–	–	#	#	–
16	166/13575	–	–	#	#	–
17	168/1807	–	–	#	+++	–
18	169/87	+++	++	#	+++	–
19	175/1257	–	–	#	#	–
20	178/00440	–	–	#	+	–
21	179/00441	–	–	#	–	–
22	181/6967	–	–	+++	++	–
23	182/Тайсон	–	–	#	+++	–
24	183/13206	–	–	#	++	–
25	184/03785	–	–	#	+++	–
26	185/03377	–	–	#	+++	–
27	186/21116	–	–	#	#	–
28	–/644	–	–	#	+++	–
29	63/290 (R-форма)	–	–	#	+++	–
30	187/99 (S-форма)	#	++	–	–	–

Примітки: «+» — ріст, редукції немає; «++» — ріст, редукція невелика; «+++» — ріст, редукція неповна; «#» — ріст, редукція повна.

У результаті вивчення антигенних властивостей було встановлено, що 24 штами мають бруцельозний R-антиген за відсутності S-антигена, про що свідчить чітка позитивна реакція в ПРА з позитивною R-бруцельозною сироваткою та негативна реакція з S-сироваткою.

Установлено зміну типових властивостей штамів 78/3131, 157/4151, 169/87 і 68/Ж, а саме спостерігали утворення уреазі та продукування цитохром-оксидази, ріст культури не тільки у присутності тіоніну, що є характерним для R-форм, а й на НРА з фуксином (1:50 000 та 1:100 000). H₂S продукував лише штам 68/Ж. Як контрольні штами використали *B. ovis* 63/290 (R-форма) та *B. abortus* 187/99 (S-форма). У результаті вивчення антигенних властивостей було встановлено, що зазначені чотири штами мають бруцельозний S-антиген за відсутності R-антигена. Це може бути пов'язаним з тим, що раніше використовували застарілу класифікацію, де вважали, що *B. ovis* володіє стійкістю до анілінових барвників.

Для ідентифікації чотирьох штамів бруцел, які не відповідали за своїми біохімічними властивостями виду *B. ovis*, проводили Bruce-Ladder ПЛР (рис.).

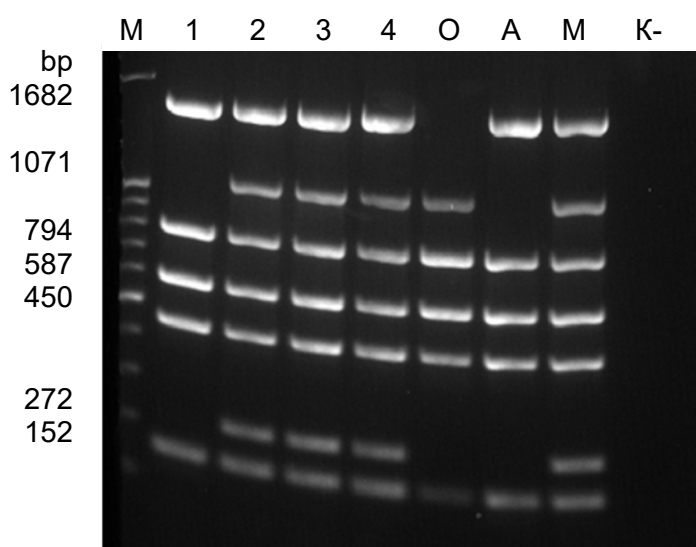


Рис. Результати типування штамів бруцел за Bruce-Ladder ПЛР: М — маркер; К — негативний контроль; 1 — штам 68/Ж; 2 — штам 78/3131; 3 — штам 157/4151; 4 — штам 169/87; О — *B. ovis* 63/290; А — *B. abortus* 187/99; М — *B. melitensis* Rev-1.

Виходячи з отриманих даних, у штаму 68/Ж виявили характерні для виду *B. abortus* делеції в генах *omp31* і *ABC transporter binding protein*, а також була відсутня делеція в гені *wboA*, яка є типовою для виду *B. ovis*. Штами 78/3131, 157/4151 та 169/87 мали характерну для

виду *B. melitensis* делецію в гені *omp31*. Крім того, спостерігали утворення специфічного амплікону довжиною 218 п. н., який дозволив віднести дані штами до *B. melitensis* Rev-1.

Цей штам широко використовують для вакцинації під час профілактики бруцельозу овець у багатьох країнах світу, та при цьому, урахувавши, що для виготовлення вакцини штам не інактивують, можна передбачити його появу в зразках клінічного матеріалу від вакцинованих тварин [9, 10]. Відомо, що вакцину на основі *B. melitensis* Rev-1 ніколи не використовували на території України, та ймовірно потрапляння цього штаму в країну могло відбутися в результаті завезення вакцинованих тварин. Для більш детального охарактеризування зазначених штамів існує необхідність у повногеномному секвенуванні.

Отже, одним з важливих напрямів підтримання колекцій мікроорганізмів є встановлення видової приналежності штамів, а також визначення їхньої автентичності, особливо за тривалого зберігання та в процесі відтворення із застосуванням новітніх методів досліджень та керуючись вимогами сучасної систематики бактерій [11]. Було встановлено, що культури бруцел з колекції мікроорганізмів ННЦ «ІЕКВМ» належать до видів *B. ovis*, *B. melitensis* і *B. abortus*.

Висновки. Проведено біохімічні, культуральні, антигенні та молекулярно-генетичні дослідження архівних штамів бруцел, яких раніше було віднесено до виду *B. ovis*. Отримані дані свідчать про стабільність основних властивостей бруцел за тривалого зберігання як у разі багаторазового пасажування, так і утримання колекції у ліофільно висушеному стані. Визначення автентичності штамів, що зберігаються впродовж тривалого часу, із застосуванням новітніх методів досліджень є невід'ємною частиною належного підтримання колекції мікроорганізмів.

Список літератури

1. OIE (World Organisation for Animal Health). Chapter 3.8.7. Ovine epididymitis (*Brucella ovis*) (version adopted in May 2015). In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. Paris: OIE, 2018. URL: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.07_OVINE_EPID.pdf.
2. Gouletsou P. G., Fthenakis G. C. Microbial diseases of the genital system of rams or bucks. *Veterinary Microbiology*. 2015. Vol. 181, No. 1–2. P. 130–135. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.016>.
3. Blasco J. M. *Brucella ovis*. In: Nielsen K. H., Duncan J. R. (eds) *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. P. 352–378. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781351069687>.
4. Бусол В. А., Бабкин А. Ф., Жованик П. Н. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Киев: Урожай, 1991. 176 с.
5. Alton G. G. et al. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: INRA, 1988. 190 pp. ISBN: 9782738000422.
6. Olsen S. C., Palmer M. V. Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years. *Veterinary Pathology*. 2014. Vol. 51, No. 6. P. 1076–1089. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985814540545>.
7. Бабкін А. Ф., Обуховська О. В. Бруцельоз: сучасні аспекти епізоотології. *Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб.* 2012. Вип. 96. С. 204–205. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/vetmed_2012_96_81.
8. López-Gofí I. et al. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008. Vol. 46, No. 10. P. 3484–3487. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00837-08>.
9. Coelho A. M. et al. Impact of *B. melitensis* Rev-1 vaccination on brucellosis prevalence. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2015. Vol. 39, No. 3. P. 261–270. DOI: <https://doi.org/10.3906/vet-1408-27>.
10. Ponsart C. et al. *Brucella melitensis* Rev.1 vaccination generates a higher shedding risk of the vaccine strain in alpine ibex (*Capra ibex*) compared to the domestic goat (*Capra hircus*). *Veterinary Research*. 2019. Vol. 50, No. 1. P. 100. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0717-0>.
11. Sanogo M. et al. Importance of identification and typing of brucellae from West African cattle: a review. *Veterinary Microbiology*. 2013. Vol. 164, No. 3–4. P. 202–211. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.009>.

STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF *BRUCELLA OVIS* STRAINS ISOLATED ON THE TERRITORY OF UKRAINE DURING 1973–2019

Marchenko N. V., Lymanska O. Yu., Kutsenko V. A., Gerilovych A. P., Bolotin V. I.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

The article presents data on the biological properties of *Brucella* strains, which were kept in the collection of microorganisms of NSC 'IECVM' previously and determined as *Brucella ovis* by biochemical tests. It was found that during long-term storage strains did not lose their properties according to passports. Four strains 78/3131, 157/4151, 169/87, and 68/Ж grew not only in the presence of thionine, which is characteristic of R-forms, but also in the media with fuchsin (1:50,000 and 1:100,000). When studying the antigenic properties, it was found that these strains have *Brucella* S-antigen and the absence of R-antigen. Additionally, molecular genetic typing revealed that four strains belonged to other species of *Brucella*

Keywords: ovine infectious epididymitis, PCR