

INFLUENCE OF LIOPHILIZATION PROCESS ON THE SAFETY OF ACTIVITY AND SPECIFICITY OF TUBERCULIN FOR MAMMALIANS

Zavgorodniy A.I., Bilushko V.V.

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

Baranov B.S.

State Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv

The results of research experiments on laboratory animals concerning safety of the main indicators of diagnostic performance (biological activity, specificity) of experimental micro series of dry purified tuberculin (PPD) for the mammals after prolonged storage are presented in the paper.

УДК 636.09:616.98

РОЗРОБКА ТА ВИПРОБУВАННЯ «НАБОРУ ТЕСТ-ШТАМІВ *LISTERIA SPP.* ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ CAMP-TEST ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ»

Ковтун В.А.*

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Лістеріоз, як одна з емерджентних зоонозних харчових інфекцій, потребує особливої уваги з боку ветеринарних і медичних працівників. Актуальність підвищеної уваги до цього захворювання зумовлена зростанням питомої ваги лістеріозу в інфекційній патології та збільшенням кількості зареєстрованих випадків у людей; недооцінкою рівня ризику виникнення та розповсюдження лістеріозу не лише з продуктами харчування, а й з бактеріоносіями; загибеллю сільськогосподарських тварин і витратами на профілактичні заходи, значними економічними збитками від захворюваності, зниженням продуктивності [1]. Це зумовлює необхідність науково-методичного удосконалення системи виявлення, оцінки та контролю цих ризиків на всіх етапах моніторингу. На жаль, в Україні моніторинг багатьох емерджентних інфекцій проводиться за допомогою імпортованих засобів діагностики. Тому, розроблення та застосування вітчизняних діагностиків, як однієї із складових системи моніторингу, є необхідним для розробки комплексних національних програмних досліджень емерджентних інфекцій.

Мета роботи – розробка та випробування набору тест-штамів *Listeria spp* для проведення CAMP-test та контролю якості поживних середовищ.

Матеріали та методи досліджень. Розробку «Набору тест-штамів *Listeria spp* для проведення CAMP-test та контролю якості поживних середовищ» проводили із використанням виділених нами штамів лістерій: *Listeria seeligeri 0811s*, *Listeria ivanovii 0811i* [2]. А також штамів із Національного центру штамів мікроорганізмів: *Listeria monocytogenes 92U002*, *Listeria monocytogenes Mon02*, *Listeria innocua 92U005*, *Staphylococcus aureus KV25*, *Rhodococcus equi 1*, *Escherichia coli Esi 5*.

Перед початком досліджень вищезгадані штами було перевірено на відповідність паспортним характеристикам основних культурально-морфологічних, тинкторіальних, біохімічних та гемолітичних властивостей.

Культуральні, морфологічні, біохімічні та гемолітичні властивості досліджували за загальноприйнятими методиками [3]. Постановку CAMP-test проводили згідно ДСТУ ISO 11290 з деякими змінами: додано культуру *Listeria seeligeri 0811s* до контрольних штамів і подовжено термін культивування від 24 до 48 годин [4].

Для перевірки якості поживних середовищ використовували *Listeria monocytogenes 92U002* (позитивний контроль) та *Escherichia coli Esi 5* (негативний контроль), дослідження проводили відповідно до ДСТУ ISO 11133.

Усі дослідження проводили у п'яти повторах.

Розроблений набір було перевірено за наступними показниками: зовнішній вигляд та колір; наявність сторонніх домішок, тріщин флаконів (ампул), щільність закупорки, етикетування; стерильність (відсутність контамінації сторонньою бактеріальною і грибною мікрофлорою); специфічність (визначення типовості росту на середовищах та визначення гемолітичних властивостей) та активність (визначення концентрації мікробних клітин).

Стерильність (відсутність контамінації сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою) визначали згідно однойменного ДСТУ 4483:2005.

Специфічність (типовість росту на середовищах) визначали шляхом висіву культур на поживні середовища МПБ (з додаванням 5 % сироватки коня та 1-го відсотка 40 %-го розчину глюкози), МПА та селективні Palsam і Oxford. Культивування проводили протягом 24 годин за температури 37±1 °С. З отриманих добових культур з щільного середовища та рідкого виготовляли мазки та фарбували їх за Грамом.

Гемолітичні властивості та проведення CAMP-test визначали шляхом культивування культур за температури 37±1 °С протягом 24–48 годин на готовому до використання комерційному стандартизованому кров'яному середовищі. Визначення гемолітичних властивостей та постановку CAMP-test проводили згідно ДСТУ ISO 11290 з деякими змінами: *Listeria seeligeri 0811s* було додано до тест-штамів для проведення CAMP-test з терміном культивування від 24 до 48 годин [5, 6].

Активність (концентрації мікробних клітин) визначали методом граничних розведень за загальноприйнятою методикою. Культивування проводили протягом 24 годин за температури 37±1 °С.

Результати досліджень. У результаті аналізу паспортних даних було встановлено, що для досягнення поставленої мети кандидатами у набір можуть бути: *Listeria seeligeri 0811s*, *Listeria ivanovii 0811i*, *Listeria monocytogenes 92U002*, *Listeria innocua 92U005*, *Staphylococcus aureus KV25*, *Rhodococcus equi 1* та *Escherichia coli Esi 5*.

Культури *Listeria spp.* у рідкому поживному середовищі МПБ через 24–48 годин культивування утворювали ріст у вигляді помутніння. На щільному поживному середовищі МПА культури мали вигляд округлих, напівпрозорих, випуклих колоній S-форми молочно-білого кольору з цільними краями та гладенькою поверхнею. На селективних середовищах Palsam та Oxford культури давали ріст у вигляді темно-зелених та темно-сірих колоній з чорним ореолом відповідно (Рис. 1 та Рис. 2).

Бактеріальні клітини під мікроскопом мали вигляд грампозитивних дрібних коротких паличок правильної форми із заокругленими кінцями, що були розміщені в мазках поодинокі або в коротких ланцюжках у вигляді римської літери «V».

* – Науковий керівник – доктор вет. наук, професор, член-кореспондент НААН Ушкалов В.О.

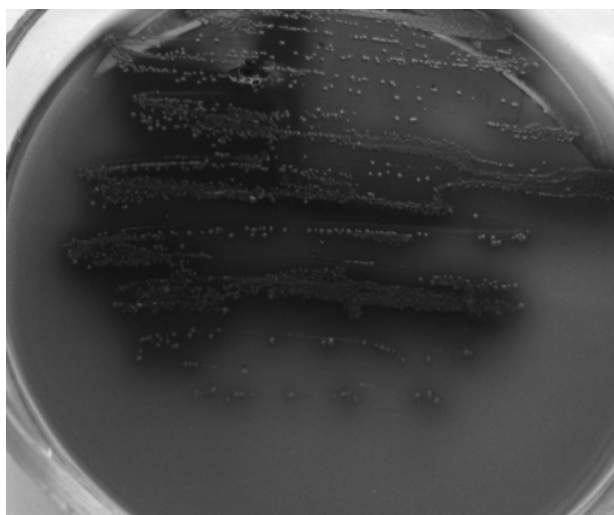


Рис. 1. Піст *Listeria ivanovii* 0811i на середовищі Palcam, 24 години (фото Ковтун В.А., Ушкалов В.О.)

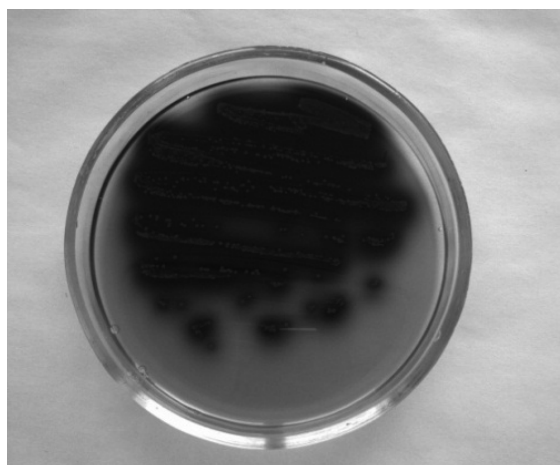


Рис. 2. Піст *Listeria ivanovii* 0811i на середовищі Oxford, 24 години (фото Ковтун В.А., Ушкалов В.О.)

Результати досліджень культур щодо біохімічних властивостей наведено в таблиці 1. За результатами даних досліджень встановлено, що *L. monocytogenes* 92U002 ферментує з утворенням кислоти без газу: глюкозу, лактозу, мальтозу та рамному та слабо – сахарозу та маннозу. Культура *L. ivanovii* 0811i ферментує з утворенням кислоти без газу: глюкозу, лактозу, ксилозу та мальтозу, а також слабо сахарозу та маннозу. *L. seeligeri* 0811s ферментує з утворенням кислоти без газу глюкозу, лактозу, мальтозу, ксилозу та маннозу, а культура *L. innocua* 92U005 ферментує з утворенням кислоти без газу: глюкозу, лактозу, мальтозу, а також слабо сахарозу.

Таблиця 1 – Результати біохімічних досліджень штамів-кандидатів до «Набору тест-штамів *Listeria* spp. для проведення CAMP-test та контролю якості поживних середовищ»

Цукор	Штам	<i>L. monocytogenes</i> 92U002	<i>L. ivanovii</i> 0811i	<i>L. seeligeri</i> 0811s	<i>L. innocua</i> 92U005
глюкоза		+	+	+	+
лактоза		+	+	+	+
мальтоза		+	+	+	+
маніт		-	-	-	-
сахароза		+ -	+ -	-	+ -
сорбіт		-	-	-	-
дульцит		-	-	-	-
інозит		-	-	-	-
ксилоза		-	+	+	-
рамноза		+	-	-	-
маноза		+ -	+ -	+	-
арабіноза		-	-	-	-

Примітка: «+» – ферментація; «+ -» – слабка ферментація; «-» – відсутня ферментація

На кров'яному агарі культура *L. monocytogenes* 92U002 давала вузьку зону гемолізу, *L. ivanovii* 0811i навколо колоній давала широку зону β-гемолізу, *L. seeligeri* 0811s – слабку реакцію β-гемолізу, а культура *L. innocua* 92U005 не мала гемолітичних властивостей.

У CAMP-test культура *L. monocytogenes* 92U002 мала позитивну реакцію невеликої зони гемолізу біля *St. aureus* KV25 (також невелика зона гемолізу спостерігалася і біля *Rh. equi* 1), *L. ivanovii* 0811i давала позитивну реакцію з *Rhodococcus equi* 1 у вигляді широкого гемолізу. Культура *L. seeligeri* 0811s мала позитивну реакцію біля штриха *St. aureus* KV25, утворюючи невелике розширення зони гемолізу біля штриха, що ставало більш явним при культивуванні протягом 48 годин. Культура *L. innocua* 92U005 давала негативну реакцію (Рис. 3).

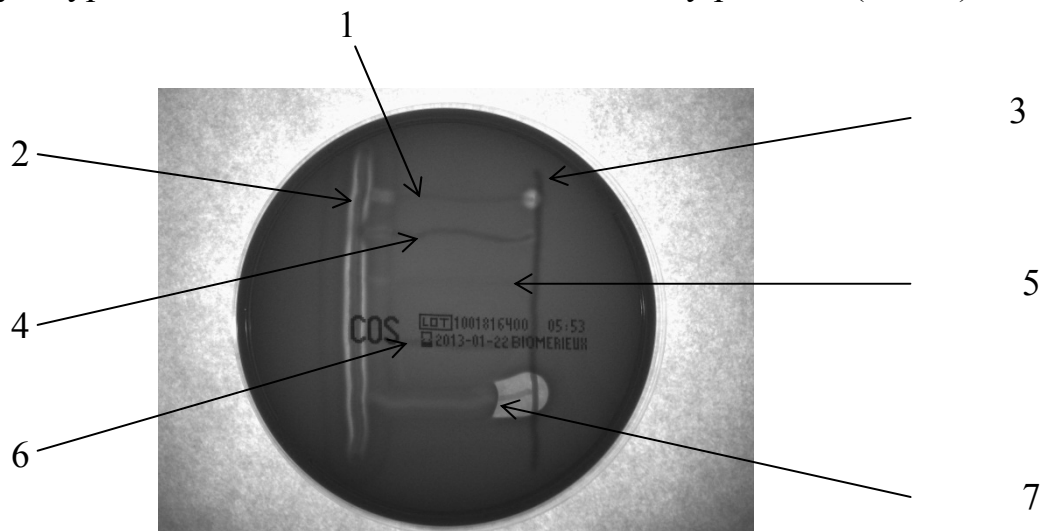


Рис. 3. Результати постановки CAMP-test з дослідними штамами. (фото Ковтун В.А., Ушкалов В.О.)

Примітка: 1 – *L. monocytogenes* 92U002; 2 – *St. aureus* KV25; 3 – *Rh. equi* 1; 4 – *L. monocytogenes* Mon02; 5 – *L. seeligeri* 0811s; 6 – *L. innocua* 92U005; 7 – *L. ivanovii* 0811i

Використання набору тест-штамів для проведення контролю якості поживних середовищ проводили згідно ДСТУ ISO 11133. Дослідними середовищами були Palcam та Oxford. В якості негативного контролю використовували штам *Escherichia coli* Esi 5, в якості позитивного – *Listeria monocytogenes* 92U002. При цьому на середовищах спостерігався ріст дослідної культури *Listeria monocytogenes* 92U002, а ріст *Escherichia coli* Esi 5 був відсутній. У той час, як на МПА та в МПБ був характерний ріст *Escherichia coli* Esi.

Отримані результати досліджень послугували підґрунтям для формування нормативної документації та досьє на «Набір тест-штамів *Listeria spp.* для проведення CAMP-test та контролю якості поживних середовищ» з метою його державної реєстрації в Україні.

Реєстраційні дослідження проводили комісійно за участю фахівців Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Гаркавенко Т.О., канд. вет. наук) відповідно до «Методики реєстраційних випробувань Набору тест-штамів *Listeria spp.* для проведення CAMP-test та контролю якості поживних середовищ з метою його реєстрації на території України», розглянутої і схваленої на засіданні Науково-методичної комісії ДНКІБШМ 17 січня 2013 року, протокол № 1. За результатами досліджень було встановлено, що ліофільно висушені культури із набору являли собою пористу масу у вигляді таблетки білого кольору у флаконах об'ємом 5 см³. Сторонні домішки були відсутні, тріщин флаконів не виявлено, флакони щільно закупорені гумовими корками і обкатані алюмінієвими ковпачками з відповідними етикетками. Тест-штами були не контамінованими сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою.

За своїми культуральними, морфологічними, біохімічними та гемолітичними властивостями штами відповідали паспортним характеристикам. У флаконах з культурами концентрація мікробних клітин була 10⁶ КУО/см³.

За результатами випробувань було проведено процедуру державної реєстрації «Набору тест-штамів *Listeria spp.* для проведення CAMP-test та контролю якості поживних середовищ» в Україні.

Даний набір знайде широке використання в лабораторній практиці при виділенні, ідентифікації та вивченні мікроорганізмів з роду *Listeria*. А також при розробці та впровадженні інших методів дослідження мікроорганізмів з роду *Listeria*, де є необхідність позитивних і негативних контролів, якими можуть бути еталонні штами з набору.

Висновки та перспективи подальших досліджень. 1. Сформовано набір із штамів *Listeria seeligeri* 0811s, *Listeria ivanovii* 0811i, *Listeria monocytogenes* 92U002, *Listeria innocua* 92U005, *Staphylococcus aureus* KV25, *Rhodococcus equi* 1 та *Escherichia coli* Esi 5 за допомогою яких можливо проводити диференціацію збудників лістеріозу бактеріологічним методом і контроль якості поживних середовищ.

2. Підготовлено нормативну документацію на «Набір тест-штамів *Listeria spp.* для проведення CAMP-test та контролю якості поживних середовищ» та проведено його міжвідомчі випробування результати яких стали підґрунтям для його державної реєстрації.

3. Перспективним вбачається використання даного набору тест-штамів для оцінки контролю бактеріологічних досліджень на лістеріоз та як тест-системи для виділення та ідентифікації лістерій за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Список літератури

1. Литвин, В.Ю. Патогенные бактерии, общие для человека и растений: проблемы и факты [Текст] / В.Ю. Литвин, Е.Н. Емельяненко, В.И. Пушкарева // Микробиология. – 1996. – № 2. – С. 76–83. 2. Ковтун, В.А. Порівняльне вивчення ізолятів роду *Listeria* з референтними штамами Бельгійської колекції культур [Текст] / В.А. Ковтун, В.О. Ушкалов, Л.М. Виговська // Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин і держ. наук.-дослід.

контрольного Ін-ту ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів, 2012. – Вип. 13, № 3–4. – С. 195–201. 3. Лабораторна діагностика лістеріозу тварин [Текст] : метод. рек. / Т.О. Бондар [та ін.]. – К., 2007. – 32 с. 4. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підрахування *Listeria monocytogenes* [Текст]. Частина 1. Метод виявлення : ДСТУ ISO 11290-1:2003 (ISO 11290-1:2003) – Увед. вперше ; чинний від 2003-10-02. – К. : Держспоживстандарт України, 2005. – 18 с. – (Нац. стандарт України). 5. Parker, J.N. The Official Patient's Sourcebook on Listeriosis: A Revised and Updated Directory for the Internet Age [Text] / J.N. Parker, Ph. M. Parker. – San Diego: Printed in the United States of America, 2002. – 160 p. 6. Goldfine, H. *Listeria monocytogenes*: pathogenesis and host response [Text] / H. Goldfine, H. Chen. – New York : Springer science, 2007. – 287 p.

DEVELOPMENT AND TEST «KIT TEST- OF LISTERIA SPP. STRAINS FOR THE CAMP-TEST AND QUALITY CONTROL OF NUTRIENT MEDIA»

Kovtun V.A.

The State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv

The article presents the results of developing and testing of "Test-set of *Listeria spp.* strains for the camp-test and quality control of nutrient media" which found that the strains selected candidates according to their cultural, morphological, biochemical and hemolytic properties were suitable for use in the above set. The results served as the basis for the formation of regulatory documents and files on the "Test-set of *Listeria spp.* strains for the camp-test and quality control of nutrient media" and the conduct of its state registration in Ukraine.

УДК 619:831.004

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Красочко П.А., Красочко И.А., Станкуть А.Э.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск, Республика Беларусь

Чижик С.А.

ГНУ «Институт тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

Исследование в сфере нанотехнологий являются одним из самых перспективных направлений науки и техники. В настоящее время металлические нанопорошки и другие виды наноматериалов находят широкое применение во многих отраслях промышленности, включая производство электронной техники, пищевых продуктов и др. Считается, что удельный вес производства наноматериалов с каждым годом будет возрастать [2].

Высокая биологическая активность наночастиц *in vivo*, их активная роль в биокинетических процессах послужили поводом для изучения антибактериальных и противовирусных свойств наночастиц [3]. Имеются данные, что наночастицы серебра размером 25, 80 и 130 нм, а так же их агломераты интенсивно поглощаются клетками печени, альвеолярными макрофагами и нейроэндокринными клетками крыс соответственно линий BRL3A, MAC и PC-12 [7]. Продемонстрирована высокая антибактериальная, направленная против золотистого стафилококка и кишечной палочки, активность коллоидных растворов наносеребра в составе перевязочного материала и других перевязочных материалов [8]. Доказано что наночастицы серебра обеззараживают более 100 видов опасных бактерий вирусов и грибов [5].

Современные исследования действия коллоидных ионов серебра показали, что они обладают выраженной способностью обезвреживать вирусы оспавакцины, некоторые штаммы вируса гриппа, энтеро- и аденовирусов. К тому же они оказывают положительный терапевтический эффект при лечении вирусного энтерита и чумы собак. При этом выявлено преимущество терапии коллоидным серебром по сравнению со стандартной терапией [4, 6].

Особый интерес представляют исследования противовирусных свойств наночастиц серебра по отношению к вирусам животных.

Цель нашей работы – исследовать противовирусные свойства наночастиц серебра *in vivo* касательно вируса болезни Ауески.

Материалы и методы исследований. Для исследования использовали эпизоотический штамм вируса болезни Ауески свиней КМИЭВ-106 (титр вируса 6,0 ТЦД 50/мл), выделенный в ноябре 2008 году в лаборатории диагностики РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», а также наночастицы серебра в концентрации 5 мкг/мл на 2 % целлюлозе и 30 белых мышей массой 18–20 грамм.

Наночастицы серебра готовили следующим образом. В стеклянную емкость наливали 30 мл ПЭГ 200. В эту же емкость добавляли 1,5 мл 0,05 нормального водного раствора $AgNO_3$. Полученный раствор выдерживался в течение 10 мин. Затем в него добавляли 0,75 мл водного раствора гидразина концентрации 0,05 н. В результате окислительно-восстановительной реакции образовывался коричнево-серый коллоидный раствор серебра. Полученный раствор помещали в центрифугу на 15 мин (4000 об/мин). В результате центрифугирования раствор расслаивался. В осадке были сконцентрированы коллоидные частицы серебра. В прозрачной части – побочные продукты реакции восстановления. Прозрачный слой отделялся от осадка декантацией. К очищенному таким образом осадку добавлялось 20 мл ПЭГ 200. На полученную композицию воздействовали ультразвуком в течение 10 минут до образования однородного коллоидного раствора. Операцию центрифугирования /диспергирования повторяли 3 раза.

Измерение размеров наночастиц выполнялось в лаборатории нанопроцессов и технологий «Института тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова НАН Беларуси» при помощи атомно-силового микроскопа (АСМ) – NT-206 в контактном режиме. При этом использовались кремниевые зонды («MikroMasch» Co, Эстония) NSC11 с константой жесткости 3 Н/м.

Закрепление частиц на подложке выполняли при помощи специальной методики подготовки образцов, которая заключалась в гидрофилизации подложки и последующем осаждении наночастиц из суспензии L-B-L способом. Для осуществления гидрофилизации кремниевую подложку помещали в раствор, состоящий из 2 мл раствора аммиака, 2 мл пероксида водорода и 10 мл воды и выдерживали в течение 15 мин при 75 °С. Затем промывали дистиллированной водой и высушивали. Подложку выдерживали в коллоидном растворе наночастиц в течение 5–10 мин., затем промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе [1].

С целью изучения противовирусных свойств наночастиц серебра было сформировано 6 групп мышей по 5 голов: 1 группа – мышей вначале обрабатывали наночастицами серебра в дозе 0,3 мл в течение 2 дней, а затем заражали вирусом болезни Ауески в дозе 0,2 мл; 2 группа – вначале животных заражали вирусом болезни Ауески в дозе 0,2 мл, затем обрабатывали наночастицами серебра в течение 2 дней в дозе 0,3 мл; 3 группа – заражали вирусом болезни Ауески в дозе 0,2 мл; 4 группа – контроль наночастиц серебра; 5 группа – контроль (интактные животные). За животными производили наблюдение в течение 14 дней.

Результаты исследований. После получения наночастиц серебра проведено их изучение методом атомно-силовой микроскопии [1].