

ВОСТАНОВЛЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ B.MELITENSIS 16 M И BRUCELLA ABORTUS 544

Н.Н. Зинина*^{ORCID}, Б.А. Еспембетов^{ORCID}, Н. Сырым^{ORCID}, С.Е. Алпысбаева^{ORCID}, М.К. Сармыкова^{ORCID},
А.Р. Әбдімұхтар^{ORCID}, Е.Б. Серікбай^{ORCID}, А.Т. Төлеухан^{ORCID}, А.М. Анарбекова^{ORCID},
М.М. Мауленбаева^{ORCID}

«Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ РК,
пгт Гвардейский, Казахстан
*n.zinina@biosafety.kz

Аннотация. При испытании противобруцеллезных вакцин важную роль играет изучение заражающей дозы контрольных штаммов. Для восстановления вирулентных свойств контрольных штаммов *Brucella melitensis* 16 M и *Brucella abortus* 544 необходимо проводить многократные последовательные пассажи в разных дозах (начиная от 1 000 000 колониеобразующих единиц, КОЕ /см³ до 5 КОЕ /см³), через организм чувствительных лабораторных животных. В данном случае для проведения экспериментальных работ нами были взяты 54 головы морских свинок (самцы) весом 350-380 г., из которых созданы 9 групп по 6 голов каждой. В статье отражены ход и результаты исследований определения минимальной фиксирующей заражающей дозы контрольных эталонных штаммов *Brucella melitensis* 16 M и *Brucella abortus* 544.

По результатам проведенных исследований определена минимальная заражающая доза (5 КОЕ) бруцелл после девятого пассажа, которые вызывают генерализованную форму бруцеллеза. Отработанные вирулентные фиксирующие дозы (5 КОЕ /см³) штаммы *Brucella melitensis* 16 M и *Brucella abortus* 544, могут применяться для контрольного заражения при постановке различных опытов по определению и оценки иммуногенности противобруцеллезных вакцин и химиопрофилактики.

Ключевые слова: бруцеллез; доза; штамм; вирулентность; морские свинки.

Введение

В организме зараженных животных бруцеллы живут и размножаются внутри клеток ретикуло-эндотелиальной системы. Это дает основание относить их к числу внутриклеточных паразитов, хотя иногда они могут находиться при бактеримии в цельной крови внеклеточно. Проникнув в организм человека и животного, бруцеллы обычно задерживаются в лимфоидных тканях и обуславливают развитие патоморфологических изменений в виде ретикуло-эндотелиальных пролифераторов и некробиотических очагов. Эти патологические изменения зависят от степени вирулентности данных культур [1].

Среди лабораторных, так и среди свежесделанных культур бруцелл встречаются штаммы с различной степенью вирулентности. В опытах на морских свинках высоко вирулентные штаммы бруцелл вызывают развитие генерализованной инфекции. При длительном периодическом культивировании в условиях *in vitro* бруцеллезных культур *Brucella abortus* через каждые 3-5 месяца, а *Brucella melitensis* 2-3 месяца на плотной *Brucella Agar Base* (BAB) с добавками и жидкой *Brucella Broth Base* (BBB) питательных средах, вирулентность постепенно снижается вместе с числом перевивок штаммов. Эти неблагоприятные явления, для восстановления исходных вирулентных свойств штаммов *Brucella abortus* и *Brucella melitensis* преодолеваются путем проведения многократных последовательных пассажей патогенных микробов через организм морских свинок, повышая их вирулентность до 5 колониеобразующих единиц (КОЕ) тем самым влияя на остроту течения инфекционного процесса вызывающего генерализованную форму бруцеллеза. Дозы 5-10 КОЕ по данным многих авторов и результатов исследований, развитие генерализованной инфекции

после такого заражения наступают в течение 4-5 недель, а по результатам наших собственных исследований наступает в течение 2-х недель [2].

Целью наших исследований являлось восстановление вирулентности контрольных штаммов *Brucella melitensis* 16 М и *Brucella abortus* 544 через организм морских свинок при многократном последовательном пассажировании, добиваясь снижения в минимальной заражающей дозе (5 КОЕ) контрольных штаммов *Brucella melitensis* 16 М и *Brucella abortus* 544 которые необходимы при экспериментальных научных исследованиях для оценки иммуногенности противобруцеллезных вакцин.

Материалы и методы

Для проведения экспериментальных исследований были использованы 54 головы морских свинок с живой массой 350-380 г. Для серологических и бактериологических исследований применяли биохимические реактивы, красители, питательные среды.

Фенотипические свойства штаммов *Brucella melitensis* 16 М, *Brucella abortus* 544 изучали путем использования культурально-морфологических, серологических, бактериологических и других методов исследований по общепринятой схеме ФАО/ВОЗ [3, 4].

Результаты исследований

Освежение эталонных контрольных штаммов *Brucella melitensis* 16 М, *Brucella abortus* 544 проводили путем их пересева *in vitro* на питательные среды ВАВ с добавками (агар-агар, глюкоза, глицерин, L-цистин, дрожжевой экстракт) и ВВВ.

Для восстановления вирулентных свойств эталонных штаммов *Brucella melitensis* 16М, *Brucella abortus* 544 провели пассирование через организм 54 голов морских свинок массой 350-380 г. до девятого пассажного уровня.

В результате проведенных исследований на 54 гол морских свинок установлено, что контрольные штаммы *Brucella melitensis* 16 М, *Brucella abortus* 544 подвергнутые биоконтролю, сохраняли свои исходные типовые свойства согласно паспортным характеристикам данных штаммов. После освежения и проведения полного биологического контроля лабораторных штаммов *Brucella melitensis* 16 М и *Brucella abortus* 544 перешли к проведению опытов по определению минимальной заражающей дозы на морских свинок. Для постановки опыта были взяты 54 гол морских свинок, из которых созданы 9 групп по 6 голов каждой. Животным вводили штаммы *Brucella melitensis* 16 М, *Brucella abortus* 544 в разных дозах:

I группа – 1 000 000 КОЕ /см³, II группа - 1 00 000 КОЕ/см³, III группа – 10 000 КОЕ/см³, IV группа – 1000 КОЕ/см³, V группа – 100 КОЕ/см³, VI группа – 50 КОЕ/см³, VII группа – 20 КОЕ/см³, VIII группа – 10 КОЕ/см³, IX группа – 5 КОЕ/см³ подкожно в пах справа в объеме по 1 см³. После заражения за животными ежедневно велись наблюдения за общим состоянием и взятием крови из сердца с интервалом 7-14 сут. для серологического исследования на бруцеллез в РБП. Результаты исследования сывороток крови, взятых от опытных животных представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты серологических исследований при определении минимальной заражающей дозы контрольных штаммов *Brucella melitensis* 16 М, *Brucella abortus* 544 на морских свинок

№ п/п	Штаммы	группы	№ пассажа	Доза заражения контрольных штаммов КОЕ	Результаты РБП после заражения морских свинок в сутках	
					7	14
1	<i>Brucella melitensis</i> 16 М	I	1	1000 000	-	+++
2	<i>Brucella abortus</i> 544			1000 000	-	+++
3	<i>Brucella melitensis</i> 16 М	II	2	100 000	-	+++

4	Brucella abortus 544			100 000	-	+++
5	Brucella melitensis 16 М	III	3	10 000	-	++++
6	Brucella abortus 544			10 000	-	++++
7	Brucella melitensis 16 М	IV	4	1 000	-	++++
8	Brucella abortus 544			1 000	-	++++
9	Brucella melitensis 16 М	V	5	1 00	-	++++
10	Brucella abortus 544			1 00	-	++++
11	Brucella melitensis 16 М	VI	6	50	-	++++
12	Brucella abortus 544			50	-	++++
13	Brucella melitensis 16 М	VII	7	20	-	++++
14	Brucella abortus 544			20	-	++++
15	Brucella melitensis 16 М	VIII	8	10	-	++++
16	Brucella abortus 544			10	-	++++
17	Brucella melitensis 16 М	IX	9	5	-	++++
18	Brucella abortus 544			5	-	++++
Примечания: «-» - отрицательный результат; «+» - положительный результат в крестах						

Данные таблицы 1 показывают, что исследованные пробы в крови от морских свинок с I по IX группы после заражения штаммом *Brucella melitensis* 16 М, штаммом *Brucella abortus* 544 на 7 сутки в серологических тестах (РБП) - были отрицательными. Тогда как на 14 сутки в РБП в сыворотках крови от животных с I по IX группы наблюдали мелко зернистый агглютинат у животных зараженных *Brucella melitensis* 16 М и крупно зернистый агглютинат с выраженным просветлением у животных зараженных *Brucella abortus* 544. Полученные позитивные серологические результаты указывают на то, что в организме у всех подопытных морских свинок циркулируют возбудители бруцеллеза.

После заражения через 14 суток проведено патологоанатомическое вскрытие всех экспериментальных животных с I по IX группы и отобраны для бактериологического исследования внутренние органы (печень, почка, селезенка), лимфатические узлы (заглоточный, нижнешейный, правый и левый пах, параортальный) и костный мозг. Затем проведены бактериологические высевы из органов, лимфоузлов и костного мозга на питательный плотный ВАВ и жидкий ВВВ среды. Результаты бактериологических исследований представлены в таблице 2.

Приготовленные мазки на предметных стеклах, фиксированные пламенем и окрашенные по Граму 48 час. культур бруцелл *Brucella melitensis* 16 М и *Brucella abortus* 544 при микроскопии в поле зрения не наблюдали постороннюю микрофлору.

Таблица 2 – Результаты бактериологических исследований органов, лимфатический узлов и костного мозга морских свинок, зараженных штаммами *Brucella melitensis* 16 M, *Brucella abortus* 544 последовательно в дозах от 10⁶ КОЕ (1 пассаж) до 5 КОЕ (9 пассаж)

№ п/п	Штаммы	Группы	№ пассажа	Кол-во жив-х, голов	Доза заражения КОЕ	Рост культур								Костный мозг	Количество выделенных культур из органов	Количество отсутствия роста культур в органах	% выделенных культур из органов	% отсутствия культур в органах
						Лимфоузлы					Орган							
						заглоточный	нижний шейный	правый пах	левый пах	парааортальный	печень	почки	селезенки					
1	<i>Brucella melitensis</i> 16 M	I	1	3	1000 000	+	+	+	+	+	+	-	+	+	26	1	97	3
2	<i>Brucella abortus</i> 544			3	1000 000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100
3	<i>Brucella melitensis</i> 16 M	II	2	3	100 000	+	+	+	+	+	-	+	+	+	26	1	97	3
4	<i>Brucella abortus</i> 544			3	100 000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100
5	<i>Brucella melitensis</i> 16 M	III	3	3	10 000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100	-
6	<i>Brucella abortus</i> 544			3	10 000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100
7	<i>Brucella melitensis</i> 16 M	IV	4	3	1 000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100	-
8	<i>Brucella abortus</i> 544			3	1 000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100
9	<i>Brucella melitensis</i> 16 M	V	5	3	1 00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100	-
10	<i>Brucella abortus</i> 544			3	1 00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100
11	<i>Brucella melitensis</i> 16 M	VI	6	3	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100	-
12	<i>Brucella abortus</i> 544			3	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100
13	<i>Brucella melitensis</i> 16 M	VII	7	3	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100	-
14	<i>Brucella abortus</i> 544			3	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100
15	<i>Brucella melitensis</i> 16 M	VIII	8	3	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100	-
16	<i>Brucella abortus</i> 544			3	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100
17	<i>Brucella melitensis</i> 16 M	IX	9	3	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100	-
18	<i>Brucella abortus</i> 544			3	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27	-	100

Примечания: «-» - отсутствие роста культур бруцелл; «+» рост культур бруцелл

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о проявлении генерализованной формы инфицирования бруцеллезом опытных морских свинок и снижении минимальной заражающей дозе до 5 КОЕ штаммов *Brucella melitensis* 16 М и *Brucella abortus* 544. Таким образом, достигнута цель научно-исследовательской работы по восстановлению вирулентности штаммов *Brucella melitensis* 16 М и *Brucella abortus* 544.

Заключение

По результатам проведенных экспериментальных исследований установлено, что минимальная заражающая доза штаммов *Brucella melitensis* 16 М, *Brucella abortus* 544 достигла 5 КОЕ, так как она вызывала у морских свинок генерализованный процесс бруцеллезной инфекции. Следовательно, отработанная минимальная заражающая доза штаммов *Brucella melitensis* 16 М и *Brucella abortus* 544 может использоваться для контрольного заражения при оценке иммуногенности противобруцеллезных вакцин и химиопрофилактики.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № BR218004/0223).

Литература

1. Жованник П.Н. Бруцеллез // Киев, 1975. – С. 222
2. Иванов Н.П. Бруцеллез животных и меры борьбы с ним // Алматы, 2007. – С. 221
3. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut national de la recherche agronomique 147, rue de l'Université, 75007//IJRA Paris J. – 1988. – ISB №2. – 7380 – 0042-8. – P. 145.
4. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) Sixth Edition Volume 2, 2008. – P.38.

В. MELITENSIS 16 М ЖӘНЕ BRUCELLA ABORTUS 544 ШТАММДАРЫНЫҢ УЫТТЫЛЫҒЫН ҚАЙТА ҚАЛПЫНА КЕЛТІРУ

Н.Н. Зинина*^{ORCID}, Б.А. Еспембетов^{ORCID}, Н. Сырым^{ORCID}, С.Е. Алпысбаева^{ORCID}, М.К. Сармыкова^{ORCID},
А.Р. Әбдімұхтар^{ORCID}, Е.Б. Серікбай^{ORCID}, А.Т. Төлеухан^{ORCID}, А.М. Анарбекова^{ORCID},
М.М. Мауленбаева^{ORCID}

ҚР ДСМ «Биологиялық қаіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты»,
Гвардейский ктк, Қазақстан
*n.zinina@biosafety.kz

Аннотация. Бруцеллезге қарсы вакциналарды сынау кезінде бақылау штамдарының инфекциялық дозасын зерттеу маңызды рөл атқарады. *Brucella melitensis* 16 М және *Brucella abortus* 544 бақылау штамдарының вирулентті қасиеттерін қалпына келтіру үшін әртүрлі дозаларда (колония түзетін 1 000 000 бірліктен бастап, 5 КТБ/см³ дейін), сезімтал зертханалық жануарлардың денесінен қайталап егу арқылы жүргізіледі. Бұл жағдайда тәжірибелік жұмысты жүргізу үшін салмағы 350-380 г болатын 54 бас теңіз шошқасын (еркек) алдық, олардан әрқайсысы 6 бастан 9 топ құрдық. Мақалада *Brucella melitensis* 16 М және *Brucella abortus* 544 бақылау эталондық штамдарының төменгі бекітілген жұқпалы дозасын анықтау бойынша зерттеу жұмыстарының жүргізу барысы мен нәтижелері көрсетілген.

Зерттеу нәтижелері бойынша зертханалық жануарлар теңіз шошқаларының ағзасынан тоғызыншы рет егуден кейінгі бруцелланың ең төменгі зарардандыру дозасы (5 КТБ) анықталды. *Brucella melitensis* 16 М және *Brucella abortus* 544 штамдарының уытты зарардандыру бекітілген дозалары (5 КТБ/см³) бруцеллезге қарсы вакциналардың және

химиофилактиканың иммуногенділігін анықтау және бағалау үшін әртүрлі эксперименттерді жүргізу кезінде инфекцияны бақылау үшін қолдануға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: бруцеллез; мөлшер; уыттылығы; теңіз шошқалары.

RESTORATION OF VIRULENCE OF B.MELITENSIS 16 M STRAINS AND BRUCELLA ABORTUS 544

N.N. Zinina*^{ID}, B.A. Yespembetov^{ID}, N. Syrym^{ID}, S.E. Alpysbayeva^{ID}, M.K. Sarmykova^{ID},
A.R. Abdimukhtar^{ID}, Y.B. Serikbay^{ID}, A.T. Toleukhan^{ID}, A.M. Anarbekova^{ID},
M.M. Maulenbayeva^{ID}

«Research Institute for Biological Safety Problems» Ministry of Health of the Republic of
Kazakhstan, Guardeysky, Kazakhstan

*n.zinina@biosafety.kz

Abstract. When testing anti-brucellosis vaccines, an important role is played by studying the infecting dose of control strains. To restore the virulent properties of the control strains *Brucella melitensis* 16 M and *Brucella abortus* 544, it is necessary to carry out multiple successive passages in different doses (starting from 1,000,000 colony-forming units, CFU/cm³ to 5 CFU/cm³), through the body of sensitive laboratory animals. In this case, for experimental work, we took 54 heads of guinea pigs (males) weighing 350-380 g, from which we created 9 groups of 6 heads each. The article reflects the progress and results of research into determining the minimum fixing infectious dose of the control reference strains *Brucella melitensis* 16 M and *Brucella abortus* 544.

Based on the results of the studies, the minimum infectious dose (5 CFU) of *Brucella* after the ninth passage, which causes the generalized form of brucellosis, was determined. Spent virulent fixing doses (5 CFU/cm³) strains of *Brucella melitensis* 16 M and *Brucella abortus* 544 can be used for control infection when setting up various experiments to determine and evaluate the immunogenicity of anti-brucellosis vaccines and chemoprophylaxis.

Keywords: brucellosis; dose; strain; virulence; guinea pigs.