

ОСОБЛИВОСТІ ДОВГОСТРОКОВОГО ЗБЕРІГАННЯ БАКТЕРІЙ ВИДУ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Ушкалов В.О., Виговська Л.М.

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

*У статті наведено результати вивчення біологічних властивостей референс-штаму *Listeria monocytogenes* з колекції НЦШМ ДНКІБШМ. Визначено рівень біологічної активності (за культурально-морфологічними, біохімічними та гемолітичними властивостями) культури в різному фізіологічному стані.*

У колекції НЦШМ ДНКІБШМ зберігається та підтримується група референс-штамів бактерій роду *Listeria*, які використовуються для контролю якості поживних середовищ та за умови внутрішньородової диференціації збудника. Штами зберігаються в колекції з 2006 року в ліофільному стані. Біологічні властивості ліофілізованих культур різних таксономічних видів вивчали інші автори [1-2]. Проте відомості про стабільність біологічних властивостей і рівень біологічної активності штамів лістерій, що зберігалися тривалий термін у ліофільному стані, обмежені. У зв'язку з цим, метою роботи було визначення рівня біологічної активності референс-штаму *Listeria monocytogenes* 3А, що зберігався в ліофільному стані впродовж 3 років, за культурально-морфологічними, біохімічними, гемолітичними властивостями.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження був референс-штам *Listeria monocytogenes* 3А. Рівень біологічної активності (накопичення живих мікробних клітин у 24-годинної бульонної культури, біохімічні, гемолітичні властивості) визначали до та після ліофілізації, та впродовж терміну збереження штаму: один, два та три роки. Для ліофілізації культури в якості буферної суміші використовували середовище Файбіча, яке змішували з 24-годинною бактеріальною культурою у співвідношенні 1:1. Ліофілізацію проводили на лабораторній установці LP-3 фірми SOAN. Параметри висушування:

- тиск – Р – 4,5 mB;
- температура заморожування матеріалу в морозильній камері – 73 °С;
- температура рефрижератора в LP-3 – 45 °С;
- термін висушування – 20 - 24 год.

Кількість життєздатних мікробних клітин визначали шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО/см³) [3]. Для визначення рівня біохімічної активності культури користувались середовищами Гіса з цукрами [3]. В-гемолітичну активність штаму визначали на кров'яному агарі с дефібринованою кров'ю барана [4]. Статистичну обробку результатів експериментальних досліджень проводили загальноприйнятими методами статистики [5].

Результати досліджень. У результаті проведених досліджень було визначено, що в підготовленої до ліофілізації культури *L. monocytogenes* 3а накопичення життєздатних мікробних клітин становило 1,0-1,1x10⁹ КУО/см³; у ліофілізованій культурі – 0,75-0,8x10⁹ КУО/см³, тобто безпосередньо при ліофілізації культура втратила 23 % життєздатних мікробних клітин (табл. 1).

Таблиця 1 – Накопичення біомаси штаму *L. monocytogenes* 3А, КУО/см³ (M ± m, n = 5)

Проведені дослідження	До ліофілізації	Після ліофілізації	Культури, що зберігалася в ліофільному стані		
			1 рік	2 роки	3 роки
КУО/см ³	1,0x10 ⁹ ±0,05	0,77x10 ⁹ ±0,1	0,76x10 ⁹ ±0,05	0,75x10 ⁹ ±0,07	0,73x10 ⁹ ±0,03

- вірогідно по відношенню до значення показника (при P ≤ 0,05)

У культури, що зберігалася впродовж одного року цей показник становив $0,75 \times 10^9 \pm 0,05$ КУО/см³; два роки – відповідно $0,72 \times 10^9 \pm 0,07$ КУО/см³; три роки – відповідно $0,71 \times 10^9 \pm 0,03$ КУО/см³. Тобто за один рік зберігання в ліофільному стані культура втрачала 1-2 % життєздатних мікробних клітин.

Результати визначення рівня ферментативної та гемолітичної активності культури відображені в таблиці 2.

Таблиця 2 – Ферментативна та гемолітична активність штаму *L. monocytogenes* 3А, (n = 5)

Проведені дослідження	До ліофілізації	Після ліофілізації	Культури, що зберігалася в ліофільному стані		
			1 рік	2 роки	3 роки
Глюкоза	+++	+	+	+	+
Мальтоза	+++	+	+	+	+
Рамноза	++	-+	-+	-+	-+
Ксилоза	++	-+	-+	-+	-+
Діаметр зони В-гемолізу навколо колоній	3-4 мм	1,5-2 мм	1,5-2 мм	1,5-2 мм	1,5-2 мм

Примітки: Рівень ферментативної активності штаму: + - відповідає розщепленню 25%, ++ 50%, +++ 75%, ++++ 100% середовища Гіса після 24 годин культивування штаму; -+ розщепленню 25% середовища на 48 годину культивування штаму

Досліджений штам ферментує з утворенням кислоти без газу глюкозу, маніт, рамнозу, ксилозу; має гемолітичні властивості. До ліофілізації штам ферментував глюкозу та мальтозу на 3 хрести, рамнозу та ксилозу – на 2; на кров'яному агарі утворював колонії S-форми, оточені зоною В-гемолізу діаметром 3-4 мм. У ліофілізованій культурі інтенсивність прояву обмінних процесів була значно нижчою: штам ферментував глюкозу і мальтозу на два хрести, рамнозу та ксилозу – на -+; на кров'яному агарі утворював колонії S-форми, оточені зоною В-гемолізу діаметром 1,5-2 мм. Інтенсивність ферментування глюкози та мальтози була в три рази нижчою порівняно з аналогічними показниками штаму до ліофілізації. Інтенсивність ферментування ксилози та рамнози знизилася у 2,5 рази. Гемолітична активність штаму знизилася у два рази.

Дослідження, що проводилися через один, два та три роки зберігання штаму у ліофільному стані показали, що суттєвих змін ці показники не набули.

Результати, отримані в проведених дослідженнях, значно поповнили паспортні характеристики штаму *L. monocytogenes* 3А; термін довгострокового зберігання штаму у ліофільному стані продовжено з одного до трьох років.

Висновки. 1. Досліджено загальний вплив ліофілізації на біологічні властивості штаму *L. monocytogenes* 3А; визначено, що ліофілізована культура втратила 23% життєздатних мікробних клітин; рівень ферментативної активності культури знизився у 2,5-3 рази, гемолітичної – у два рази.

2. Визначено, що при довгостроковому зберіганні в ліофільному стані відбувається поступове зниження концентрації життєздатних мікробних клітин: ліофілізована культура втрачала до 2 % життєздатних мікробних клітин за один рік. В той же час рівень ферментативної та гемолітичної активності культури залишився на тому ж рівні, що й до ліофілізації.

Список літератури

1. Соколова, Н.А., Попова, Т.Е. Стабильность биологических свойств лиофильно высушенных бактерий [Патогенные штаммы родов *Salmonella*, *Listeria*, *Erisipelotrix*, *Pasteurella*] // Ветеринария. – 2000. – № 10. – С. 25-28.
2. Цуцаева, А.А. Нелетальные повреждения индуцируемые в биологических объектах на этапах их перевода в состояние глубокого холодого анабиоза // 1-й з'їзд Українського товариства кріобіології і кріомедицини: Тези доп. – 1995. – Харків. С. 270.
3. Кисленко, В.Н. Практикум по ветеринарній мікробіології і імунології. - М.: Колос.- 2005.
4. Лабораторна діагностика лістеріозу тварин: Методичні рекомендації / Бондар Т.О., Абрамов А.В., Івченко В.М., Рижинко В.П.- Київ, 2007.- 32с.
5. Ашмарин, И.П., Воробьев, А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медгиз, 1962. – 15 с.

PECULIARITIES OF LONG-TERM STORAGE OF BACTERIA SPECIES LISTERIA MONOCYTOGENES

Ushkalov V.O., Vygovs'ka L.M.

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

Results of study of biological characteristics of the referent strain Listeria monocytogenes from the collection of the National Center of Strains of Microorganisms SSCIBSM are presented in the paper. There was determined the level of biological activity of the culture in different physiological state (by cultural-and-morphological, biochemical and haemolytic characteristics).

УДК 619:578

ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ РОТАВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА

Финогенов А.Ю., Гудков В.Г., Виринская А.С.

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

Экспериментальное изучение тест-системы «Рота-антиген», которая включает в себя иммуноглобулин ротавирусный, конъюгат, положительный и отрицательный контроль, буферные растворы, стоп-реагент, планшет 96 луночный показало, что внешний вид компонентов тест-системы соответствует ТУ ВУ 600049853.12-2009. Чувствительность тест-системы, определенная путем титрования производственного штамма вируса в ИФА и определения его конечного разведения по антигену составила 100%. Специфичность тест-системы, определенная путем индикации ротавирусов в пробах из коллекции заведомо положительных и заведомо отрицательных по наличию ротавирусов образцов составила 100%. Оптическая плотность средняя для положительного контроля составила не менее 0,6 о.е., для отрицательного контроля – не более 0,1 о.е. и находилась неизменной на протяжении 14 месяцев.

Введение. Как известно, ротавирусная инфекция, поражая преимущественно молодняк различных видов животных, наносит существенный экономический ущерб животноводству и государству в целом. Эффективность профилактических и противозооотических мероприятий существенно зависит от качества специфической лабораторной диагностики ротавирусной инфекции, поскольку диагноз этого заболевания может быть установлен лишь путем выявления возбудителя инфекции. Анализ данных литературы показал, что наиболее эффективным современным методом индикации ротавирусов является иммуноферментный анализ (ИФА), который выгодно отличается от других методов исследования высокими показателями чувствительности, специфичности, воспроизводимости, а также возможностью автоматизации исследований и объективизации их результатов.

Индикация ротавирусов методом ИФА, как правило, основывается на обнаружении общих для всех ротавирусов группы А антигенов, что позволяет использовать одну и ту же тест-систему для диагностики заболевания у различных видов животных, например, лошадей, крупного рогатого скота, свиней и др.

Целью исследований являлась разработка показателей качества новой диагностической тест-системы в отношении распространенного инфекционного заболевания животных – ротавирусной инфекции. При этом ставилась задача создания конкурентоспособной тест-системы, в наибольшей мере отвечающей потребностям пользователей по таким основным параметрам, как специфичность (не менее 96%), чувствительность (не менее 96%), срок хранения (не менее года), воспроизводимость результатов (в пределах допуска для используемого дозирующего и фотометрического оборудования), термостабильность (сохранение активности препарата даже при отклонениях от температурных условий транспортировки и хранения).