

## ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 619:616.981.51:615.373/.383:636.1

### Визначення ефективності методик виділення спор збудника *Bacillus anthracis* із ґрунту

Рубленко І.О. , Рубленко С.В. 

Білоцерківський національний аграрний університет

 БНАУ, м.Біла Церква, Соборна площа, 8/1. E-mail: rubs@ukr.net



Рубленко І.О., Рубленко С.В. Визначення ефективності методик виділення спор збудника *Bacillus anthracis* із ґрунту. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2019. № 2. С. 29–35.

Rublenko I.O., Rublenko S.V. Vyznachennja efektyvnosti metodyk vydilennja spor zbudnyka *Bacillus anthracis* iz g'runtu. Naukovyj visnyk veterynarnoi' medycyny, 2019. № 2. PP. 29–35.

Рукопис отримано: 06.10.2019р.

Прийнято: 03.11.2019р.

Затверджено до друку: 17.12.2019р.

doi: 10.33245/2310-4902-2019-152-2-29-35

Захворювання тварин та людей на сибірку продовжує з'являтися у традиційно ендемічних регіонах, що свідчить про реальну загрозу виникнення хвороби на будь-якій території: у країнах Європи, Азії, та інших регіонах земної кулі. Спори збудника сибірки дуже стійкі у навколишньому середовищі, вони залишаються життєздатними до 300 років. За сприятливих умов активація (мобілізація метаболічних процесів) спор відбувається протягом 1–2 хв із наступною ініціацією і проростанням (20–30 хв) та виростанням у вегетативну клітину (60–90 хв). Зоонозне захворювання на сибірку є актуальним не лише для України, а й для більшості країн Європи та всього світу, оскільки захворюваність залишається на високому рівні, щорічно реєструють тисячі летальних випадків, на лікування хворих витрачають великі кошти громадян та держав, а виробники тваринницької продукції несуть значні економічні збитки через загибель тварин та проведення протиепізоотичних, протиепідеміологічних і профілактичних заходів.

Наведено результати визначення ефективності методик виділення спор збудника штаму *Bacillus anthracis* UA-07 із ґрунту. Встановлено, що використання методики із застосуванням твіну-80, 1 % сироваткового альбуміну у фосфатно-сольовому буфері та агару PLET, дозволяє підвищити виділення спор збудника із ґрунту на 16,8 % ( $p < 0,001$ ). Водночас слід зазначити що за незначної контамінації досліджуваного ґрунту чи матеріалу, ймовірно, існує проблема отримання недостовірного результату дослідження. За удосконаленою методикою для дослідження необхідно всього 2,5 г ґрунту, тоді як за методикою № 1 – 60 г, № 2 і 3 – 95, № 4 – 10 г, окрім того для відмивання спор використовують сучасні детергенти, більшу швидкість центрифугування, 100 % етиловий спирт, який знищує ґрунтову вегетативну та деяку спорову форму мікрофлори (окрім спор *Bac. anthracis*).

**Ключові слова:** сибірка, спори, *Bacillus anthracis*, тварини, ґрунт, поширення, методика.

**Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень.** Епізоотичне благополуччя України має стратегічне значення для розвитку аграрного сектору економіки. Сучасний розвиток світової ринкової конкуренції зумовлює збільшення продуктивності галузі тваринництва й одночасно потребує вдосконалення профілактики інфекційних захворювань, оскільки їх збудники мають здатність змінювати свої біологічні властивості, у зв'язку з чим існує ризик розповсюдження їх, інфікування та загибелі тварин і людей [1–3].

Щорічна реєстрація у світі спалахів захворювання тварин і людей на сибірку призводить до економічних збитків. Це спонукає вчених до подальшого вивчення особливостей біологічних властивостей збудника *Bacillus anthracis* (морфологічних і патогенних, чутливості до антибактеріальних препаратів), пошуку нових препаратів для профілактики захворювання і вдосконалення засобів лабораторної діагностики, оскільки збудник сибірки тривалий час зберігає патогенність у природних умовах і може використовуватися як чинник біологічної зброї

або тероризму [4–8]. Однією з причин вивчення збудника є поширеність *Bacillus anthracis* у різних країнах та його зміни внаслідок впливу різноманітних екзо- та ендогенних чинників. Зокрема, лише на території України знаходиться більше 13,5 тис. захоронень тварин, що загинули від сибірки.

Оскільки спори сибірки довготривалий час зберігаються у ґрунті, який може бути і резервуаром, тому завданням було удосконалити метод, описаний в інструкції виділення спор *Bac. anthracis* із ґрунту [9–10].

**Мета дослідження** полягала у визначенні ефективності методик виділення спор збудника *Bac. anthracis* із ґрунту.

**Матеріал і методи дослідження.** Дослідження проводили в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ). Під час визначення ефективності методик проводили порівняння отриманих показників за досліджень виділення спор із стерильного та нестерильного ґрунту.

Для проведення бактеріологічних методів дослідження, зокрема виділення спор із ґрунту, обрали зареєстровані у різних країнах (Україна, Республіка Білорусь та Російська Федерація) методики та сучасних науковців щодо досліджень *Bac. anthracis* [11–15].

Кількість КУО підраховували після культивування бактеріологічних чашок із посівами в термостаті за температури 37 °С протягом 24 год. У дослідженнях використовували проби ґрунту, попередньо видаливши з них корінці рослин, камінці тощо – стерильний (до внесення спор) та нестерильний ґрунт. Для отримання стерильних проб ґрунт стерилізували в автоклаві за 1,5 атм протягом 20 хв, двічі, з інтервалом 24 год. Готували спорову суспензію та визначали її концентрацію.

Для отримання спорової зависі культуру культивували на середовищі МПА за температури 37 °С протягом 7 діб. Для змивання культури з поживного середовища використовували 0,85 % розчин натрію хлориду. Потім спорову суспензію із штаму *Bac. anthracis* UA-07 розводили за методом серійних розведень [16] у пробірках зі стерильним МПБ (по 9 см<sup>3</sup>). Для цього у першу пробірку вносили 1,0 см<sup>3</sup> суспензії, перемішували та 1,0 см<sup>3</sup> суміші переносили у другу пробірку і знову перемішували (3 рази, не доторкуючись стінок пробірки), аналогічний об'єм переносили з другої у третю. Таких розведень проводили до отримання розведення 10<sup>-6</sup>.

Для кожного наступного розведення використовували стерильну піпетку. Виконували

розведення (10<sup>-2</sup>–10<sup>-6</sup>) спорової суспензії [17] та по 0,2 см<sup>3</sup> вносили у флакони зі стерильним ґрунтом. Наступні дії із підготовленими пробами проводили відповідно до описаних методик [11–14] (табл. 1).

Для постановки методики № 5 відбирали 2,5 г ґрунту, розміщуючи його у скляну колбу і заливали 12–15 см<sup>3</sup> розчину для екстракції (100 см<sup>3</sup> дистильованої води, 1,22 г сахарози, 1,0 см<sup>3</sup>, твін-80). Після ручного струшування протягом 1 хв витримували 30–40 хв у стані спокою. Відбирали 3 см<sup>3</sup> рідини з поверхні надосадової рідини у стерильну пробірку, додавали 6–8 см<sup>3</sup> БСА/ФСБ (фільтрованого 1 % бичачого сироваткового альбуміну у 0,01 моль/см<sup>3</sup> фосфатно-сольовому буфері, рН 7,0–7,2) – для забезпечення осадження спор центрифугуванням, яке проводили за 5000 об./хв, протягом 10 хв.

Надосадову рідину зливали шляхом автоклавування, а до осаду додавали 1,0 см<sup>3</sup> БСА/ФСБ. Потім очищали спори штаму від сторонньої мікрофлори, додаючи до осаду 5 см<sup>3</sup> 100 % етиловий спирт (який отримували шляхом додавання до 96 % етилового спирту висушеного, зневодненого CuSO<sub>4</sub>) протягом 1 год за кімнатної температури. Суспензії із ґрунту висівали на живильні середовища МПА (м'ясо-пептонний агар), кров'яний МПА (КМПА) середовища PLET та агар Хоттінгера, содовий МПА. Слід зазначити, що за використання у досліді нестерильного ґрунту (до внесення спор штаму *Bac. anthracis* UA-07) суспензію висівали на 2–3 бактеріологічні чашки методом Дригальського на середовища PLET. Застосування даного методу було пов'язано з великою кількістю ґрунтової мікрофлори, яка заважала ідентифікувати колонії *Bac. anthracis*. Культивували посіви за температури 37 °С протягом 24–48 год.

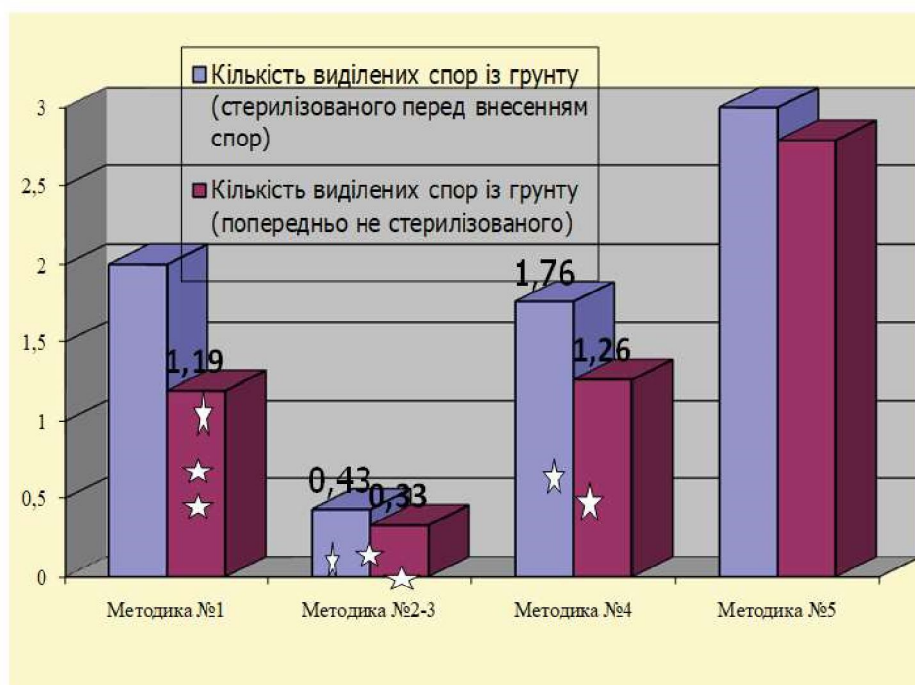
**Результати дослідження.** Результати визначення ефективності методик виділення спор *Bac. anthracis* із ґрунту представлено на рисунку 1.

За використання методик № 1–5 для виділення спор із ґрунту встановлено, що із нестерильного ґрунту отримано меншу кількість спор, ніж із стерильного. Можливо, це пов'язано із великою кількістю спор ґрунтових мікроорганізмів.

У ході дослідження ґрунту за допомогою методики № 1, з використанням 15,0 см<sup>3</sup> 0,85 % фізіологічного розчину, 15-хвилинного центрифугування за 3000 об./хв, більшу кількість спор виділяли із стерильного ґрунту (на 0,81 спор/г досліджуваного ґрунту), що становило 2,9 % спор від внесених із стерильного ґрунту та 1,8 % – із нестерильного.

Таблиця 1 – Схема дослідження спор

| Етап досліджень                                     | Методика                                                             |                                               |                                      |                                                                                        |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                     | № 1                                                                  | № 2 і 3                                       | № 4                                  | № 5                                                                                    |
| Розчин для екстракції                               | 0,85 % NaCl, до об'єму 15–20 см <sup>3</sup>                         | 0,85 % NaCl, до об'єму 15–20 см <sup>3</sup>  | сахароза-третон 30,0 см <sup>3</sup> | розчин для екстракції (дистильована вода, сахароза, Твін-80) 12–15 см <sup>3</sup>     |
| Струшування, хв                                     | 25                                                                   | 10                                            | 1                                    | 1                                                                                      |
| Осадження, хв                                       | 5–8                                                                  | 5                                             | –                                    | 30–40                                                                                  |
| Фільтрування                                        | +                                                                    | –                                             | –                                    | –                                                                                      |
| Додавання пірофосфату натрію                        | –                                                                    | +                                             | –                                    | –                                                                                      |
| Струшування, хв                                     | –                                                                    | 10                                            | –                                    | –                                                                                      |
| Температурна обробка                                | 80 хв, 65 °C                                                         | –                                             | –                                    | –                                                                                      |
| Відстоювання, хв                                    | –                                                                    | 5                                             | –                                    | –                                                                                      |
| Центрифугування                                     | 3000 об./хв, 15 хв                                                   | 1000 об./хв, 15 хв                            | 1187 об./хв, 1 хв                    | 3 см <sup>3</sup> надосадової рідини та 6–8 см <sup>3</sup> БСА/ФСБ 5000 об./хв, 10 хв |
| БСА/ФСБ                                             | –                                                                    | –                                             | –                                    | 1 см <sup>3</sup> до осаду                                                             |
| ФСБ із 0,05 % Твін-20                               | –                                                                    | –                                             | до 50 см <sup>3</sup>                | –                                                                                      |
| Центрифугування                                     | –                                                                    | 15 хв центрифугування 6000 об./хв             | 5000 об./хв 10 хв, 4 °C              | –                                                                                      |
| 100 % етанол для очищення від сторонньої мікрофлори | –                                                                    | –                                             | до осаду – 5 см <sup>3</sup> , 1 год | 5 см <sup>3</sup> 100 % етанол, 1 год                                                  |
| Надосадова рідина                                   | осад – посів на середовище МПА з 0,01 % фенолфталеїн-фосфатом натрію | до осаду додати 1 см <sup>3</sup> 0,85 % NaCl | –                                    | –                                                                                      |

Рис. 1. Кількість спор *Bacillus anthracis*, що виділено з ґрунту на МПА, КУО,

★★★★ p&lt;0,001 та ★★★ p&lt;0,01 – порівняно з показниками методики №5.

Окрім того, у методиках № 1–3 вказано проводити посів лише з осаду (після центрифугування), а надосадову рідину видаляти. Нами ж було виявлено (шляхом посіву на поживні середовища) спори *Bac. anthracis* у надосадовій рідині після центрифугування суспензії (рис. 2). Ймовірно, 3000 об./хв недостатньо для осадження всіх спор у пробі.

Під час порівняння результатів досліджень методик виділення спор *Bac. anthracis* із стерильного і нестерильного ґрунтів встановлено, що за культивування на живильному середовищі МПА кількість спор, виділених за методиками № 2 і 3, була найменшою ( $0,43 \pm 0,2$  КУО, що складало 1 % від внесених спор у 1 г ґрунту та  $0,33 \pm 0,04$  КУО – 0,8 % від внесених спор у 1 г ґрунту відповідно).

Ймовірно, меншу кількість виділених спор отримали за рахунок внесення  $15,0 \text{ см}^3$  0,85 % фізіологічного розчину та 15-хвилинного центрифугування за 1000 об./хв.

Показники, отримані за методикою № 4, були вищими за показники виділених спор із стерильного та нестерильного ґрунту, порівняно з отриманими результатами за методиками № 1–3. Більшу кількість виділених спор за методикою № 4 пов'язуємо з використанням меншої кількості ґрунту для дослідження. Внаслідок цього у пробі нестерильного ґрунту

може міститися менша кількість сторонньої мікрофлори і спори збудника сибірки більше та легше виділяються. Підтвердженням більшої ефективності використання методики є дослідження спор у стерильному ґрунті. Кількість спор перевищувала показники, отримані з використанням методик № 1–3 на 1,2–3,7 %.

Слід зазначити, що методика № 5 більш ефективна, порівняно з іншими (№ 1–4), оскільки за допомогою неї виявляють спори, за внесення у ґрунт найменшої кількості ( $16,54 \text{ КУО/г}$  ґрунту), а виділяється – найбільша кількість ( $3,0 \text{ КУО/г}$  ґрунту), як за постановки досліду зі стерильним, так і нестерильним ґрунтом. Можливо, це пояснюється (відповідно до удосконаленої методики) більшою швидкістю центрифугування, використанням детергенту твіну-80 [18]. На нашу думку, це і призвело до вищої концентрації спор у досліджуваній суспензії ґрунту.

**Обговорення.** Недоліком методик № 1–4 під час проведення дослідження щодо виділення спор із ґрунту є один із етапів видалення надосадової рідини у дезінфекційний розчин. Оскільки у ході дослідження надосадової рідини, призначеної для видалення, було виділено спори збудника. Окрім того, за постановки перших трьох методик необхідно виконувати фільтрування суспензії ґрунту через марлевий

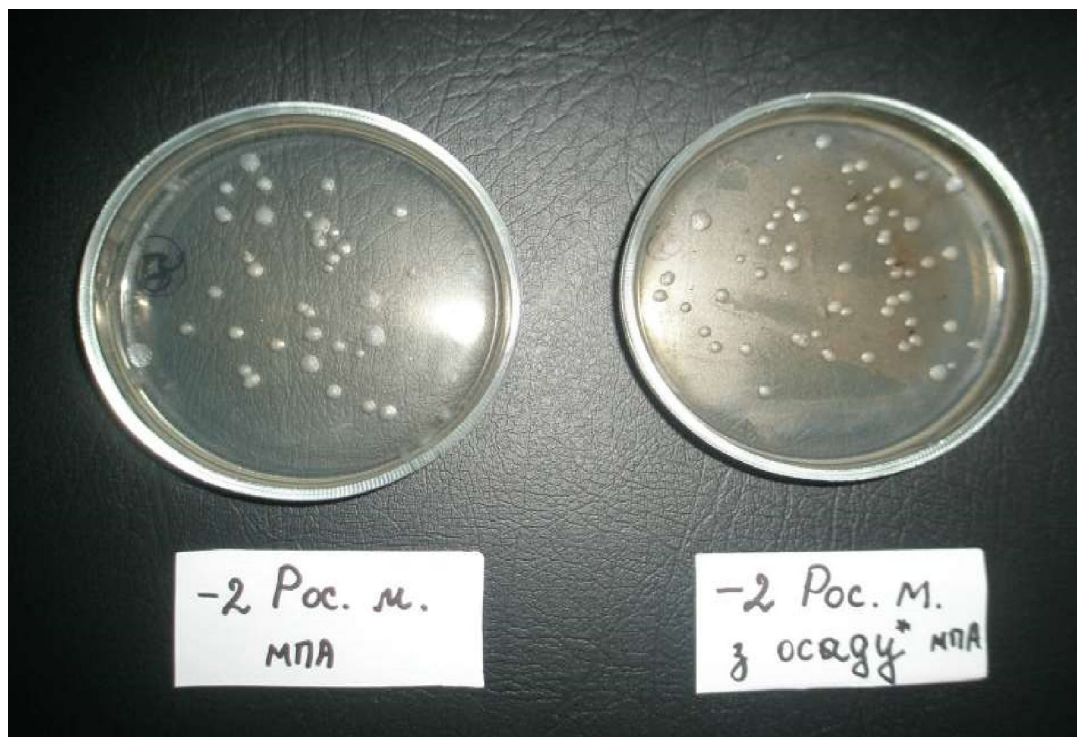


Рис. 2. Ріст *Bac. anthracis* на живильному середовищі МПА у разі виділення за методикою № 2 із надосадової рідини та осаду.

фільтр та центрифугування за 3000 об./хв, а це, ймовірно, є причиною зниження кількості виділених спор. Також, одним із недоліків є прогрівання суспензії за температури 65 °C протягом 80 хв, що не знищує всю сторонню ґрунтову мікрофлору, притаманну ґрунту і ускладнює подальшу ідентифікацію отриманих культур.

За удосконаленою нами методикою для дослідження необхідно всього 2,5 г ґрунту, тоді як за методикою № 1 – 60 г, № 2 і 3 – 95, № 4 – 10 г, використовуються сучасні детергенти (а не 0,85 % розчин натрію хлориду) для відмивання спор, більша швидкість центрифугування (5000 об./хв), 100 % етиловий спирт, який знищує ґрунтову вегетативну та деяку спорову форму мікрофлори (окрім спор *Bac. anthracis*).

**Висновки.** Використання методики із застосуванням твіну-80, 1 % сироваткового альбуміну у фосфатно-сольовому буфері та агару PLET, дозволяє підвищити виділення спор збудника із ґрунту на 16,8 % ( $p < 0,001$ ), порівняно з методикою, описаною в чинній інструкції, за використання фізіологічного розчину натрію хлориду, диференційно-діагностичного середовища МПА з додаванням 0,01 % фенолфталейну фосфату натрію.

**Відомості про дотримання біоетичних норм.** Тварин для дослідження не використовували.

**Відомості про конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Gómez J.P., Nekorchuk D.M., Liang Mao., Blackburn J.K. Decoupling environmental effects and host population dynamics for anthrax, a classic reservoir-driven disease. *Journal of PLOS one*. 2018. P. 1–20. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208621>
2. Morris L., Proffitt K., Asher V., Blackburn J. Elk resource selection and implications for anthrax management in Montana. *Journal of wildlife management*. 2015. № 80. P. 235–244. Doi: <https://doi.org/10.1002/jwmg.1016>
3. Blackburn J., Asher V., Stokke S., Hunter D. Dances with Anthrax: Wolves (*Canis lupus*) Kill Anthrax Bacteremic plains bison in Southwestern Montana. *Journal of Wildlife disease*. 2014. № 50. P. 393–396. Doi: <https://doi.org/10.7589/2013-08-204>
4. Salb A., Stephen C., Ribble C., Elkin B. Descriptive epidemiology of detected anthrax outbreaks in wild wood bison (*Bison bison* at *habascae*) in northern Canada, 1962–2008. *Journal of Wildlife Disease*. 2014. P. 459–468. Doi: <https://doi.org/10.7589/2013-04-095>
5. Blackburn J.K., Van Ert M., Mullins J.C., Hadfield T.L., Hugh-Jones M.E. The necrophagous fly anthrax transmits ion pathway: empirical and genetic evidence from wildlife epizootics. *Vector-Borne and Zoonotic Disease* 2014. *Journal of PLOS one*. 2018. 20. 14 (8). P. 576–583. Doi: <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1538>
6. Driciru M., Driciru M., Rwego I.B., Asiimwe B., Pelican K. Spatio-temporal epidemiology of anthrax in Hippopotamus amphibious in Queen Elizabeth Protected Area, Uganda. *Journal of PLOS one*. 2018. 13 (11). 21 p. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206922>. [https://www.researchgate.net/publication/329262956\\_Spatio-temporal\\_epidemiology\\_of\\_anthrax\\_in\\_Hippopotamus\\_amphibious\\_in\\_Queen](https://www.researchgate.net/publication/329262956_Spatio-temporal_epidemiology_of_anthrax_in_Hippopotamus_amphibious_in_Queen)
7. Lepheana R.J., Oguttu J.W., Nenene Q. Temporal patterns of anthrax outbreaks among livestock in Lesotho, 2005–2016. *Journal of public health*. 2018. P. 1–12. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204758>
8. Changing livestock vaccination policy alters the epidemiology of human anthrax, Georgia, 2000–2013 / I. Kracalik, et al. *Journal vaccine*. 2017. Vol. 35. Issue 46. P. 6283–6289. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.081>
9. Рубленко І.О., Скрипник В.Г. Аналіз даних епізоотичних спалахів сибірки на території України (період 1994 – 2016 рр.). *Наук. вісник вет. мед: збірник наукових праць*. Вип.1 (127). Біла Церква. 2016. №1 (127). С. 87–95.
10. Anthrax in dogs / V.G. Skrypnyk, et al. *Ветеринарна медицина*. 2014. № 1 (215). С. 14–17.
11. Інструкції з лабораторної діагностики сибірки у людей, в сировині тваринного походження та об'єктах довкілля: Наказ МОЗ України від 21.08.2002, № 321. URL: [http://www.moz.gov.ua/ua/portal/laws\\_2002.html](http://www.moz.gov.ua/ua/portal/laws_2002.html)
12. Инструкция 4.2.10–19–60–2005. Лабораторная диагностика сибирской язвы у людей и выделение возбудителя сибирской язвы из объектов внешней среды: Постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 21 ноября 2005, № 181.
13. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы: методические указания. МУК 4.2.2413–08: Утверждено Руководителем федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко от 29 июля 2008.
14. Dragon D.C., Rennie R.P. Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores. *The Society for Applied Microbiology*. 2001. № 33. P. 100–105.
15. Schuch R., V.A. Fischetti The secret life of the Anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage mediated ecological adaptations. *Plos one*. A Peer-Reviewed, one. Access journal. 2009. № 4 (8). Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00966.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19672290>
16. Загальна мікробіологія: методичні вказівки для практичної та самостійної роботи студентів факультету ветеринарної медицини з мікробіологічних методів досліджень / В.М. Зоценко, та ін. Біла Церква, 2018. 80 с.
17. Grimes S.E. A Basic Laboratory Manual for the Small-Scale Production and Testing of I-2 Newcastle Disease Vaccine. Ten-fold serial dilutions. Appendix 5. № 22. 2002. URL: <http://www.fao.org/3/ac802e/ac802e0r.htm>
18. Лабораторна діагностика сибірки тварин, індикація збудника з патологічного та біологічного матеріалу, сировини тваринного походження та об'єктів навколишнього середовища: науково-методичні рекомендації для забезпечення практичної та самостійної роботи фахівців

лабораторій та науково-дослідних установ ветеринарної медицини, викладачів та студентів факультетів ветеринарної медицини ВНЗ / В.Г. Скрипник та ін. Київ, 2015. 78 с.

# REFERENCES

1. Gómez, J.P., Nekorchuk, D.M., Liang Mao., Blackburn J.K. (2018). Decoupling environmental effects and host population dynamics for anthrax, a classic reservoir-driven disease. *Journal of PLOS one*. pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208621>

2. Morris, L., Proffitt, K., Asher, V., Blackburn, J. (2015). Elk resource selection and implications for anthrax management in Montana. *Journal of wildlife management*. no. 80, pp. 235–244.

3. Blackburn, J., Asher, V., Stokke, S., Hunter, D. (2014). Dances with Anthrax: Wolves (*Canis lupus*) Kill Anthrax Bacteremic plains bison in Southwestern Montana. *Journal of Wildlife disease*. no. 50, pp. 393–396.

4. Salb, A., Stephen, C., Ribble, C., Elkin, B. (2014). Descriptive epidemiology of detected anthrax outbreaks in wild wood bison (*Bison bison*) in northern Canada, 1962–2008. *Journal of Wildlife Disease*. pp. 459–468.

5. Blackburn, J.K., Van, ErtM., Mullins, J.C., Hadfield, T.L., Hugh-Jones, M.E. (2018). The necrophagous fly anthrax transmits ion pathway: empirical and genetic evidence from wildlife epizootics. *Vector-Borne and Zoonotic Disease* 2014. *Journal of PLOS one*. 20, 14 (8), pp. 576–583.

6. Driciru, M., Rwego, I.B., Asiimwe, B., Pelican, K. (2018). Spatio-temporal epidemiology of anthrax in Hippopotamus amphibious in Queen Elizabeth Protected Area, Uganda. *Journal of PLOS one*. 13 (11). 21 p. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/329262956\\_Spatio-temporal\\_epidemiology\\_of\\_anthrax\\_in\\_Hippopotamus\\_amphibious\\_in\\_Queen](https://www.researchgate.net/publication/329262956_Spatio-temporal_epidemiology_of_anthrax_in_Hippopotamus_amphibious_in_Queen).

7. Lepheana, R.J., Oguttu, J.W., Nenene, Q. (2018). Temporal patterns of anthrax outbreaks among livestock in Lesotho, 2005–2016. *Journal of public health*. pp. 1–12.

8. Kralik, I., Malania, L., Broladze, M., Navdarashvili, A., Imnadze, P., Ryan, S.J., Blackburn, J.K. (2017). Changing livestock vaccination policy alters the epidemiology of human anthrax, Georgia, 2000–2013. *Journal vaccine*. Vol. 35, Issue 46, pp. 6283–6289.

9. Rublenko, I.O., Skripnik, V.G. (2016). Analiz danih epizootichnih spalnih sibirki na terytorii' Ukrainy'ny (period 1994 – 2016 rr.) [Analysis of epizootic outbreaks of anthrax in Ukraine (1994 - 2016)]. *Nauk. visnik vet. med: zbirnik naukovih prac'* [Scientific Bulletin of Veterinary Medicine: Collection of Scientific Papers]. Bila Tserkva, Issue 1 (127), no. 1 (127), pp. 87–95.

10. Skrypnyk, V.G., Koziy, R.V., Skrypnyk, A.V., Rublenko, I.O. (2014). Anthrax in dogs. *Veterinarna medicina* [Veterinary medicine]. no. 1 (215), pp. 14–17.

11. Instrukcii' z laboratornoi' diagnostyki sybirky u ljudej, v syrovyni tvarynnogo pohodzhennja ta ob'jektiv dovkillja: Nakaz MOZ Ukrainy vid 21.08.2002, № 321 [Instructions for laboratory diagnostics of anthrax in humans, in raw materials of animal origin and environmental objects: Order of the Ministry of Health of Ukraine of 21.08.2002, No. 321.]. Available at: [http://www.moz.gov.ua/ua/portal/laws\\_2002.html](http://www.moz.gov.ua/ua/portal/laws_2002.html).

12. Instrukcija 4.2.10–19–60–2005 [Instruction 4.2.10–19–60–2005]. Laboratornaja diagnostika sibirskoj jazvy u

ljudej i vydelenie vzbuditelja sibirskoj jazvy iz ob'ektov vneshnej sredy: Postanovlenie Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha Respubliki Belarus' ot 21 nojabrja 2005, № 181 [Laboratory diagnosis of anthrax in humans and the isolation of the causative agent of anthrax from environmental objects: Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Republic of Belarus of November 21, 2005, No. 181].

13. Laboratornaja diagnostika i obnaruzhenie vzbuditelja sibirskoj jazvy: metodicheskie ukazanija [Laboratory diagnosis and detection of anthrax pathogen: guidelines]. MUK 4.2.2413–08: Utverzhdeno Rukovoditelem federal'noj sluzhby po nadzoru v sfere zashhity prav potrebitelej i blagopoluchija cheloveka, Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom Rossijskoj Federacii G.G. Onishchenko ot 29 ijulja 2008 [MUK 4.2.2413–08: Approved by G.G., Head of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being, Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation Onishchenko on July 29, 2008].

14. Dragon, D.C., Rennie, R.P. (2001). Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores. *The Society for Applied Microbiology*. no. 33, pp. 100–105.

15. Schuch, R., Fischetti, V.A. (2009). The secret life of the Anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage mediated ecological adaptations. // *Plos one*. A Peer-Reviewed, one. Access journal. no. 4 (8). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19672290>.

16. Zocenko, V.M., Rublenko, I.O., Andrijchuk, A.V. (2018). Zagal'na mikrobiologija: metodichni vkazivki dlja praktichnoi' ta samostijnoi' roboti studentiv fakultetu veterinarnoi' medicini z mikrobiologichnih metodiv doslidzen' [Mental practice: methodological instructions for practical and independent work of students in the Faculty of Veterinary Medicine with microbiological methods]. Bila Tserkva, 80 p.

17. Grimes, S.E. (2002). A Basic Laboratory Manual for the Small-Scale Production and Testing of I-2 Newcastle Disease Vaccine. Ten-fold serial dilutions. Appendix 5. no. 22, Available at: <http://www.fao.org/3/ac802e/ac802e0r.htm>

18. V.G. Skripnik, I.O. Rublenko, T.O. (2015). Laboratornaja diagnostyka sybirky tvaryn, indykacija zbudnyka z patologichnogo ta biologichnogo materialu, syrovyny tvarynnogo pohodzhennja ta ob'jektiv navkolyshn'ogo seredivyshha: naukovy-metodychni rekomendacii' dlja zabezpechennja praktychnoi' ta samostijnoi' roboty fahivciv laboratorij ta naukovy-doslidnyh ustanov veterinarnoi' medycyny, vykladachiv ta studentiv fakultetiv veterinarnoi' medycyny VNZ [Laboratory diagnostics of animal anthrax, indication of pathogen and biological agent, raw material of animal origin and environmental objects: scientific and methodological recommendations for ensuring the practical and independent work of specialists of laboratories and research institutions of veterinary medicine, teachers and students]. Kyiv, 78 p.

**Определение эффективности методики выделения спор возбудителя *Bacillus anthracis* с почвы**  
**Рубленко И.А., Рубленко С.В.**

Заболевания животных и людей сибирской язвой продолжает появляться в традиционно эндемичных регионах, что свидетельствует о реальной угрозе возникнове-

ния болезни на любой территории: в странах Европы, Азии и других регионах земного шара. Споры возбудителя сибирской язвы очень устойчивы в окружающей среде, они остаются жизнеспособными до 300 лет. При благоприятных условиях активация (мобилизация метаболических процессов) спор происходит в течение 1–2 мин с последующей инициацией и прорастанием (20–30 мин) и вырастанием в вегетативную клетку (60–90 мин). Сибирская язва является актуальной не только для Украины, но и для большинства стран Европы и всего мира, поскольку заболеваемость остается на высоком уровне, ежегодно регистрируют тысячи летальных случаев, на лечение больных тратят большие средства граждан и государств, а производители животноводческой продукции несут значительный экономический ущерб из-за гибели животных и проведения противоэпизоотических, противоэпидемических и профилактических мероприятий.

Приведены результаты определения эффективности методик выделения спор штамма *Bacillus anthracis* UA-07 из почвы. Установлено, что использование методики с применением твина-80, 1 % сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере и агара PLET, позволяет повысить выделение спор возбудителя из почвы на 16,8 % ( $p < 0,001$ ). Вместе с тем следует обратить внимание на то, что при незначительной контаминации исследуемого грунта или материала, вероятно, существует проблема получения недостоверного результата исследования.

По усовершенствованной методике для исследования необходимо всего 2,5 г почвы, тогда как по методике № 1 – 60 г, № 2 и 3 – 95, № 4 – 10 г, кроме того, для отмывания спор используют современные детергенты, большую скорость центрифугирования, 100 % этиловый спирт, который уничтожает почвенную вегетативную и некоторую споровую форму микрофлоры (кроме спор *Bac. anthracis*).

**Ключевые слова:** сибирская язва, споры, *Bacillus anthracis*, животные, почва, распространение, методика.

#### Determination of efficiency of the methods for isolating *Bacillus anthracis* pathogen spores from soil

Rublenko I., Rublenko S.

Diseases of animals and people with anthrax continues to appear in traditionally endemic regions, indicating a real threat of disease in any territory: in Europe, Asia and other regions of the globe. Spores of the causative agent of anthrax are very stable in the environment. It is known that they remain viable for up to 300 years. Under favorable conditions, activation (mobilization of metabolic processes) of spores occurs within 1–2 minutes, followed by initiation and germination (20–30 minutes) and growth into a vegetative cell (60–90 minutes).

Zoonotic anthrax disease is relevant not only for Ukraine, but also for most countries in Europe and around the world, as the incidence remains high, thousands of deaths are registered annually, large sums of citizens and states are spent on the treatment of patients, and producers of livestock products bear considerable economic losses due to the death of animals and carrying out anti-epizootic, anti-epidemiological and preventive measures.

The article presents the results of determining the effectiveness of methods for isolating the spores of the causative agent of the strain *Bacillus anthracis* UA-07 from the soil. It was found that using the method using Tween-80, 1 % serum albumin in phosphate-buffered saline and PLET agar, it was possible to increase the excretion of pathogen spores from the soil by 16.8 % ( $p < 0,001$ ). At the same time, it should be noted that with a slight contamination of the soil or material under study, there is probably a problem of obtaining an unreliable study result. According to our advanced methodology, only 2.5 g of soil is needed for the study, whereas according to the method № 1 – 60 g, according to the method № 2 and № 3 – 95, № 4 – 10 g. higher spin speed, uses 100% ethyl alcohol, which destroys the soil's vegetative and some spore like microflora (except for spores of *Bac. anthracis*).

**Key words:** anthrax, spores, *Bacillus anthracis*, animals, soil, distribution, methodology.



Copyright: © Rublenko I. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



Рубленко І.О.  
Рубленко С.В.

ID <https://orcid.org/0000-0002-1401-0969>  
ID <https://orcid.org/0000-0003-0678-5497>