



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-1-95-102>
УДК 619:616.98:579.843.96:621.785.9:577.152.54:661.746

Усовершенствование системы поддержания производственного штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed), применяемого для изготовления сапных диагностикумов

Е. А. Артемьева¹, Л. А. Мельникова¹, Л. И. Зайнуллин¹, Н. К. Букова²

¹ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), Научный городок-2, г. Казань, 420075, Республика Татарстан, Россия

² ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), Звенигородское шоссе, 5, г. Москва, 123022, Россия

РЕЗЮМЕ

Одним из направлений коллекционной деятельности является оптимизация существующих методов и разработка новых технологий консервации штаммов микроорганизмов, поэтому проведение работ по усовершенствованию ранее разработанных методик сохранения аутентичности штаммов является актуальной задачей. В статье приведена информация по поддержанию производственного штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) с использованием разработанной ранее системы, которая была дополнена новыми этапами согласно современным требованиям, предъявляемым к коллекционным фондам штаммов возбудителей особо опасных болезней. Предыдущая схема поддержания штамма предусматривала его хранение в нативном виде, что способствовало накоплению генетических мутаций и, как следствие, изменению свойств бактериальной клетки. Для увеличения сроков хранения данного штамма и обеспечения стабильности его биологических свойств применен метод лиофилизации. В качестве криопротектора использовали обезжиренное молоко. Сублимационную сушку проводили по выбранному режиму. Данный метод дает возможность пассировать штамм на чувствительных моделях один раз в 5 лет, что более выгодно и безопасно с экономической и биологической точек зрения. Для безопасной работы с производственным штаммом 5584 возбудителя сапа разработан метод его инактивации гамма-лучами при 30 кГр, который позволил добиться стерильности микробной взвеси и сохранить структуру бактериальных клеток. При сравнении ранее разработанной и дополненной схем установлено, что усовершенствованная система поддержания штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) позволяет исключить утрату его биологических свойств, необходимых для производства качественных сапных диагностикумов, используемых для своевременного выявления заболевания у восприимчивых животных при проведении диагностических исследований.

Ключевые слова: сап, *Burkholderia mallei*, пассаж, лиофилизация, биологические свойства, гамма-облучение

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» в рамках научно-исследовательской работы по теме «Изучение биологических характеристик штаммов возбудителей заразных и особо опасных болезней животных и их стабильности в процессе длительного хранения».

Для цитирования: Артемьева Е. А., Мельникова Л. А., Зайнуллин Л. И., Букова Н. К. Усовершенствование системы поддержания производственного штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed), применяемого для изготовления сапных диагностикумов. *Ветеринария сегодня*. 2024; 13 (1): 95–102. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-1-95-102>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Для корреспонденции: Артемьева Елена Александровна, канд. вет. наук, начальник отдела – Государственная коллекция микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Научный городок-2, г. Казань, 420075, Республика Татарстан, Россия, e-mail: artemevaelena21@mail.ru

Improved production strain maintenance technique for *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) used for glander diagnostic agent production

Elena A. Artemeva¹, Liliya A. Melnikova¹, Lenar I. Zaynullin¹, Nataliya K. Bukova²

¹ Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Nauchnyi gorodok-2, Kazan 420075, Republic of Tatarstan, Russia

² The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, 5 Zvenigorodskoye shosse, Moscow 123022, Russia

ABSTRACT

One of the aspects important for strain collection maintenance is the optimization of existing methods and development of new techniques for microbial strain preservation, that is why the improvement of previously developed methods for authentic strain preservation is an urgent task. The article provides

© Артемьева Е. А., Мельникова Л. А., Зайнуллин Л. И., Букова Н. К., 2024

© ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2024

information on the maintenance of *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) using previously developed technique, which was supplemented with new stages in accordance with modern requirements for strain collections of highly dangerous disease agents. The previous strain maintenance technique involved its storage in its native state, which facilitated accumulation of genetic mutations and, ultimately modification of bacterial cell properties. To extend the storage time of this strain and to ensure the stability of its biological properties, the freeze-drying method was used. Skimmed milk was used as a cryoprotectant. Freeze-drying was performed under selected conditions. This technique allows for the strain sub-culturing on sensitive models once every 5 years, which is more expedient and safe from an economic and biological point of view. For safe handling of *Burkholderia mallei* 5584 production strain, an inactivation technique using gamma rays at 30 kGy was developed, which allowed to achieve microbial suspension sterility and preserve the bacterial cell structure. When comparing the previously developed and supplemented techniques, it was found that the improved technique of *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) maintenance makes it possible to avoid the loss of its biological properties needed for the production of high-quality laboratory diagnostic agents used for timely disease detection in susceptible animals by diagnostic tests.

Keywords: glanders, *Burkholderia mallei*, passage, freeze-drying, biological properties, gamma irradiation

Acknowledgments: The work was funded by the Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety within the research topic "Study of the biological characteristics of strains of contagious and highly dangerous animal disease pathogens and their stability during long-term storage".

For citation: Artemeva E. A., Melnikova L. A., Zaynullin L. I., Bukova N. K. Improved production strain maintenance technique for *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) used for glander diagnostic agent production. *Veterinary Science Today*. 2024; 13 (1): 95–102. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-1-95-102>

Conflict of interests: The authors declare that there is no conflict of financial/non-financial interests associated with the paper.

For correspondence: Elena A. Artemeva, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Department – State Collection of Microorganisms, Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Nauchnyi gorodok-2, Kazan 420075, Republic of Tatarstan, Russia, e-mail: artemevaelena21@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Эпизоотическое благополучие по заразным и особо опасным инфекционным болезням, в частности по сапу, обеспечивается ветеринарной службой, которая проводит противоэпизоотические мероприятия, направленные на предупреждение заноса возбудителя на территорию Российской Федерации, посредством систематического контроля за благополучием поголовья лошадей (ослов, мулов), а также недопущения распространения заболевания и его ликвидации в случае появления [1].

Сап – это инфекционная болезнь непарнокопытных животных семейства лошадиных, вызываемая микробом, относящимся к роду *Burkholderia*, виду *mallei*, и протекающая в основном в хронической форме. В естественных условиях могут заражаться и хищники семейства кошачьих (при поедании мяса больных сапом животных), а также верблюды и человек [2, 3, 4, 5]. Данный возбудитель относится к II группе патогенности (опасности), против сапа не разработаны средства специфической профилактики и лечения, в связи с чем заболевание занимает особое место в вопросах биологической безопасности Российской Федерации [6, 7].

С конца 50-х годов прошлого столетия и до настоящего времени сап не регистрировался на территории России. Хотя в течение этого времени возникали случаи заболевания с подозрением на сап, но ни один из них не был подтвержден [8]. На сегодняшний день вспышка сапа зарегистрирована в Забайкальском крае с введением карантина по заболеванию (постановление губернатора Забайкальского края от 18.02.2023 № 8¹). Не исключена опасность возникновения новых случаев сапа в связи с неблагополучием по данному заболе-

ванию государств, граничащих с территорией России (Монголия и Китай), где часто не соблюдаются требования ветеринарного законодательства, в частности имеются факты несанкционированного обмена/перемещения скота и импортируемого животноводческого сырья [1, 9]. Кроме того, непредсказуемую эпизоотическую ситуацию по этому заболеванию могут создавать современные международные контакты, где задействованы животные, восприимчивые к сапу (торговля, гастроли цирков и театра зверей, конноспортивные соревнования, международные аукционы и др.).

В настоящее время сап часто регистрируется в Монголии, Турции, Иране, Ираке, странах Аравийского полуострова, Бразилии, Китае, Индии, на Филиппинах [9, 10, 11, 12, 13, 14]. По данным Всемирной организации здравоохранения животных, Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, Всемирной организации здравоохранения, в мире отмечается тенденция к увеличению случаев возникновения сапа у человека и животных, что относит его к возвращающимся инфекциям.

Для недопущения возникновения, завоза и проникновения этого заболевания в страну проводятся диагностические мероприятия с использованием сапных диагностикумов, выпускаемых ФГУП «Курская биофабрика – фирма «БИОК» (сыворотка сапная положительная для реакции связывания компонента – РСК; антиген сапной для РСК; маллеин и антиген сапной цветной для пластинчатой реакции агглютинации – РА) из производственного штамма *Burkholderia mallei* 5584. Его получают один раз в 5 лет из Государственной коллекции штаммов – возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве, которая занимается хранением штамма в нативном и лиофилизированном виде и поддержанием его биологических свойств. Полученные рядом авторов результаты показали, что хранение

¹ Об установлении ограничительных мероприятий (карантина) на территории города Читы: постановление губернатора Забайкальского края от 18.02.2023 г. № 8. <https://media.75.ru/documents/152305/8-ot-18-02-2023.pdf>

микроорганизмов в нативном виде не соответствует современным требованиям, так как в процессе многократных пересевов накапливаются мутации, которые приводят к изменению их изначальных биологических свойств [15, 16, 17, 18]. Ввиду того что одним из направлений коллекционной деятельности является оптимизация существующих методов и разработка новых технологий консервации штаммов микроорганизмов, актуально проведение работ по усовершенствованию ранее разработанных методов сохранения аутентичности штаммов [19, 20, 21, 22].

Исходя из вышесказанного, целью работы было усовершенствовать систему поддержания производственного штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed), используемую для сохранения его жизнеспособности и биологических свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу по поддержанию производственного штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) проводили в отделе «Государственная коллекция микроорганизмов» ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Штамм хранится в нативном виде на мясо-пептонном глицериновом агаре (МПГА) и пересеивается каждые 30 дней с проверкой биологических свойств один раз в год и в лиофилизированном виде (криопротектор – обезжиренное молоко) с определением его жизнеспособности и аутентичности заявленным паспортным данным каждые 5 лет и пассажем через организм чувствительных моделей (золотистых хомячков) один раз в год.

Ростовые свойства и морфологию клеток штамма, хранящегося в нативном и лиофилизированном виде, изучали на культурах второй генерации, выросших после посева на МПГА, мясо-пептонном глицериновом бульоне (МПГБ) и картофельной среде Павловского. Изучение тинкториальных свойств проводили микроскопией мазков, окрашенных по Граму; подвижность определяли методом висячей капли с помощью световой микроскопии. Ферментативные свойства изучали путем посева на среды Гисса и обезжиренное молоко, а также по образованию сероводорода на МПГА и индола на среде Строгова, засеянных культурой, с использованием индикаторных бумажек (в первом случае пропитанной уксусной кислотой, во втором – щавелевой кислотой), прикрепленных пробкой над поверхностью среды. Тест на наличие каталазы проводили нанесением 3%-го раствора перекиси водорода на поверхность выросшей культуры².

Патогенность штамма определяли заражением чувствительных лабораторных животных (золотистых хомячков) с последующей оценкой развития характерных клинических признаков сапа, патолого-анатомической картины поражения легких, печени, селезенки и выделением чистой культуры возбудителя.

С целью изучения агглютинабельных свойств из штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) извлекали антиген и сыворотку к нему, которые испытывали в пластинчатой РА. Сыворотку получали путем трехкратной гипериммунизации кроликов инаktivированными клетками штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) в концентрации 2×10^9 м. к./см³ инъек-

цией в краевую ушную вену с интервалом в три дня: первое введение – 0,5 см³, второе введение – 1,0 см³, третье введение – 2,0 см³. Тотальное обескровливание кроликов проводили на 7-й день после последнего введения антигена.

Сыворотку исследовали по антигенным свойствам (в пластинчатой и пробирочной РА и пробирочной РСК).

Для определения специфичности брали близкородственные в антигенном отношении штаммы возбудителей мелиоидоза и *Alcaligenes faecalis* [23]. Для этого осуществляли посев на МПГА и мясо-пептонный агар (МПА), инкубировали при 37 °С в течение 48 ч, смывали 0,85%-м раствором NaCl и использовали для постановки РА и РСК в соответствии с СанПиН 3.3686-21³.

Поддержание биологических свойств производственного штамма в соответствии с заявленными паспортными данными осуществляли посредством пассажей на золотистых хомячках, которых заражали подкожно в область затылка.

Вся экспериментальная часть работы с лабораторными животными проводилась в соответствии с основными этическими принципами проведения экспериментов на животных, изложенных в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18 марта 1986 г.). Эксперименты были научно обоснованы и утверждены Комиссией по биоэтике ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (протокол № 10 от 11.09.2023).

Для получения антигена производственный штамм *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) инаktivировали гамма-лучами на установке «Исследователь» (Россия) по ранее определенной дозе облучения 30 кГр в отделе радиобиологии⁴.

При отработке режима инаktivации применяли дозы 15, 20, 25, 30, 35 кГр. Для этого готовили клеточные взвеси с концентрацией 10^9 м. к./см³ на стерильном 0,85%-м растворе NaCl. Полноту инаktivации определяли посевом клеток на питательную среду (МПГА и МПГБ) с последующим инкубированием в течение 10 дней при температуре 37 °С.

Режим лиофилизации штамма отработывали на лиофильной установке LZ-9 (Frigera, Чехия). В качестве криопротекторных сред применяли обезжиренное молоко и сахарозо-желатиновую среду.

В данной работе использовалась система поддержания производственного штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) [22], которая была дополнена новыми этапами, отвечающими современным требованиям хранения коллекционных штаммов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для повышения качества и стандартности производственных, референтных и вакцинных штаммов необходимо тщательное изучение стабильности их биологических свойств с характерными для

³ СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней: утв. постановлением главного государственного санитарного врача РФ 28.01.2021 № 4. <https://docs.cntd.ru/document/573660140> (дата обращения: 15.11.2022).

⁴ Шашкаров В. П., Гайнутдинов Т. Р., Идрисов А. М., Гурьянова В. А., Вагин К. Н., Василевский Н. М. и др. Методические рекомендации по использованию ионизирующего излучения для инаktivации возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. Казань: МеДДоК; 2021. 17 с. <https://doi.org/10.31016/fctrb-viev-2020-2>

² Лабораторная диагностика сапа: методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2011. 22 с.

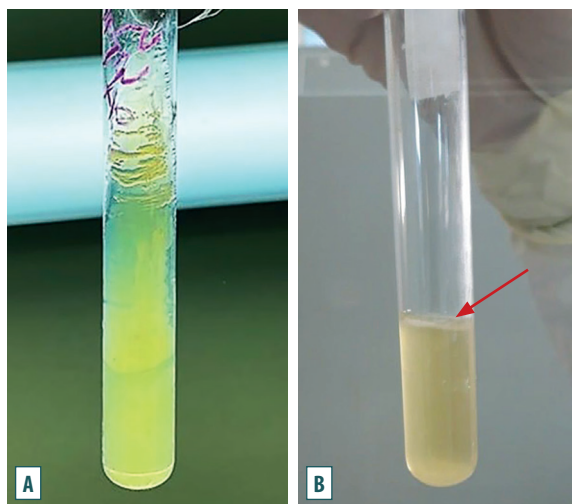


Рис. 1. Рост штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) на МПГА (А) и МПГБ (В). Красной стрелкой обозначено пристеночное кольцо и нежная пленка на поверхности среды

Fig. 1. Growth of *Burkholderia mallei* strain 5584 (Master seed) on beef-extract glycerol agar (A) and beef-extract glycerol broth (B). The ring and pellicle are indicated with a red arrow on the surface of the growth medium

возбудителя генетически закрепленными признаками: морфологическими, биохимическими, антигенными и другими [17, 24, 25]. Работа по определению жизнеспособности и изучению биологических свойств производственного штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) была проведена с использованием разработанной ранее и дополненной нами системы поддержания данного штамма возбудителя сапа, применяемого для изготовления диагностикумов, в соответствии с современными требованиями к хранению микроорганизмов [8, 22, 26].

Полученные результаты исследований показали, что штамм на МПГА давал рост в виде полупрозрачных гладких колоний с перламутровым оттенком, сливающихся на 3–5-е сут после посева в сплошной налет

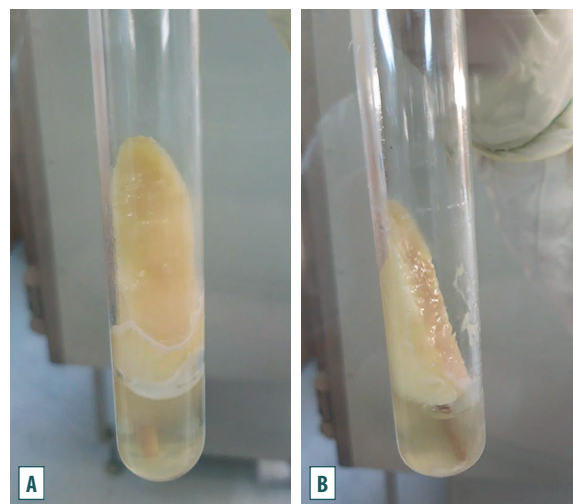


Рис. 2. Рост штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) на картофельной среде Павловского: 2-суточная культура (А); 5-суточная культура (В)

Fig. 2. Growth of *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) on Pavlovsky potato agar: 2-day culture (A); 5-day culture (B)

на поверхности среды (рис. 1А). Культура бактерий на МПГБ на 3–5-е сут вызывала помутнение среды, на ее поверхности образовывалась нежная пленка и пристеночное кольцо (рис. 1В), а также наблюдался вязкий осадок, поднимающийся со дна пробирки шпатель и разбивающийся при встряхивании.

На картофельной среде Павловского 2-суточная культура росла в виде медообразного налета ярко-желтого цвета (рис. 2А), 5-суточная культура – в виде слизистого налета с более темной окраской (рис. 2В).

В препарате «висячая капля» клетки были неподвижны, но наблюдали броуновское движение. Мазок штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed), приготовленный из 2-суточной культуры и окрашенный по Граму, при микроскопии в иммерсионной системе представлял собой зернистые палочки с закругленными концами. Бактерии – грамотрицательные, окрашивались в розовый цвет, вызывали свертывание молока без дальнейшей пептонизации (рис. 3А). При росте в бульоне наблюдали изменение цвета индикаторной бумажной полоски, что указывало на образование бактериями сероводорода (рис. 3В). Не разжижали 12%-й желатин (рис. 3С), не образовывали индол (цвет индикатора не изменялся) и каталазу.

Культура штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) не вызывала изменения окраски сред Гисса на желтый цвет и образования пузырьков газа в поплавах, так как не ферментировала сахара.

Для безопасной работы с возбудителями I–II групп патогенности (опасности), в частности при получении антигенов и гипериммунных сывороток к ним, проводят их инактивацию различными методами (физическими, механическими, химическими и др.). Предыдущая схема поддержания штамма включала инактивацию клеток автоклавированием при температуре 120 °C в течение 15 мин, что приводило к полному их разрушению. Поэтому был проведен подбор дозы гамма-облучения для штамма *Burkholderia*

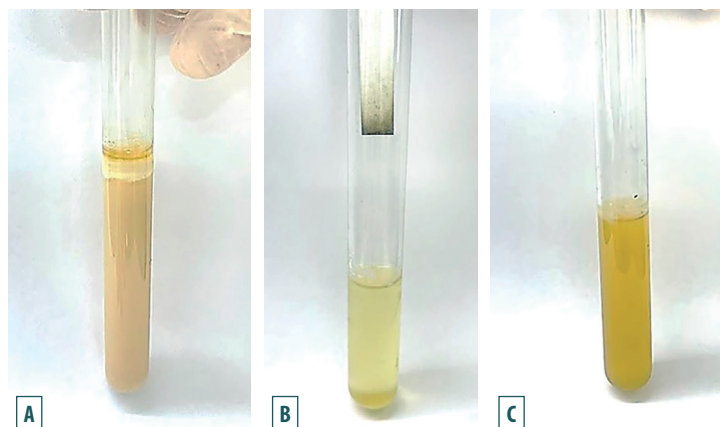


Рис. 3. Свертывание молока без дальнейшей пептонизации (А); образование сероводорода (В); отсутствие разжижения 12%-го желатина (С) культурой *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed)

Fig. 3. Milk coagulation without further peptonization (A); formation of hydrogen sulfide (B); no liquefaction of 12% gelatin (C) by *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed)

mallei 5584 (Master seed), результаты которого приведены в таблице 1.

Установлено, что облучение в дозе 30 и 35 кГр полностью инактивировало штамм, поэтому в дальнейшей работе использовалась доза 30 кГр.

Проверка агглютинабельных свойств сапной сыворотки, полученной на гамма-облученный антиген, в РА на стекле показала положительную реакцию в виде мелкозернистого агглютината, образовавшегося в течение 1–2 мин.

Патогенность штамма определяли заражением золотистых хомячков путем введения 2-суточной культуры, выращенной на МПГА при температуре 37 °С в течение 48 ч, смывой физиологическим раствором в дозе 1×10^9 м. к./см³ подкожно в область затылка, что вызывало гибель животных на 5–10-е сут. При вскрытии наблюдали следующую патолого-анатомическую картину, характерную для данного возбудителя: на месте введения имела гнойно-некротическая язва, множественные некротические узелки диаметром 2–3 мм во внутренних органах (печени, селезенке, легких). Из посевов, сделанных из внутренних органов, крови из сердца и места введения, выделена чистая культура возбудителя сапа.

Проверка антигенных свойств штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) с сывороткой, полученной на его введение лабораторным животным, показала, что в пробирочной РА титр составил 1:1600, в РСК – 1:320, в пластинчатой РА – 1:120.

Полученная сыворотка дает перекрестные реакции в РА и РСК со штаммами возбудителей мелиоидоза – 1:1600 и *Alcaligenes faecalis* – 1:40.

Таблица 2
Первоначальная и дополненная схемы поддержания штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed)

Table 2
Original and supplemented techniques of *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) maintenance

№ п/п	Первоначальная схема	Дополненная схема
1	Регулярные пересевы культуры штамма, хранящегося в нативном виде на МПГА (каждые 30 дней), с проверкой биологических свойств один раз в год	
2	Не проводили	Определение жизнеспособности и изучение биологических свойств (один раз в 5 лет) лиофилизированной культуры штамма
3	Проведение пассажа через организм чувствительных моделей (золотистых хомячков) один раз в год	Проведение пассажа через организм чувствительных моделей (золотистых хомячков) один раз в 5 лет
4	Не проводили	Проведение лиофилизации выделенной культуры после пассажа
5	Проверка культуральных свойств и морфологии колоний посевом на МПГА, МПГБ и картофельную среду Павловского	
6	Проверка тинкториальных свойств и морфологии клеток микрокопированием мазков, окрашенных по Граму	
7	Проверка подвижности и броуновского движения клеток микрокопированием культуры в препарате «висячая капля»	
8	Образование индола	
9	Проверка наличия каталазы	
10	Образование сероводорода	
11	Проверка ферментативных свойств посевом культуры на среды Гисса и обезжиренное молоко	
12	Инаktivация штамма автоклавированием при температуре 120 °С в течение 15 мин	Инаktivация штамма гамма-облучением при 30 кГр в течение 2 ч
13	Не проводили	Проверка агглютинабельных свойств в РА на стекле с сапной сывороткой
14	Проверка патогенности путем введения культуры золотистым хомячкам	
15	Проверка антигенных свойств и антигенной специфичности иммунизацией кроликов и проверкой сыворотки крови в пластинчатой РА и РСК	

Таблица 1
Определение инактивирующей дозы гамма-облучения штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed)

Table 1
Determination of *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) inactivation dose by gamma irradiation

№ п/п	Доза гамма-облучения, кГр	Инаktivация антигена
1	15	–
2	20	–
3	25	–
4	30	+
5	35	+

В целях сохранения чистоты уникальных производственных и эталонных штаммов микроорганизмов проводят их пассирование через организм чувствительных лабораторных животных [15, 27, 28, 29]. В связи с этим для поддержания биологических свойств производственного штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) согласно паспортным данным осуществлено его пассирование на золотистых хомячках. При этом была выделена чистая культура штамма, которую проверили на аутентичность и заложили на дальнейшее хранение в нативном виде, с последующими пересевами на МПГА каждые 30 дней.

Предыдущая система поддержания штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) предусматривала его хранение в нативном виде, что способствовало

накоплению генетических мутаций и, как следствие, изменению свойств бактериальной клетки [22]. Так как первостепенной задачей коллекций микроорганизмов является сохранение штаммов в неизменном состоянии в течение длительного времени, внесли в систему этап лиофилизации, которую проводили по следующему режиму:

- замораживание культуры в течение 12 ч;
- перенос культуры в морозильную установку, охлаждение плиты до -52°C ;
- включение вакуума;
- лиофилизация в автоматическом режиме в течение 12 ч;
- включение обогрева (p) через 17 ч с момента загрузки культуры при следующих параметрах: температура плиты $+10^{\circ}\text{C}$, температура среды 0°C ;
- включение обогрева (p + 1) через 18 ч при следующих параметрах: температура плиты $+20^{\circ}\text{C}$, температура среды $+5^{\circ}\text{C}$, вакуум 0,5 trr;
- окончание сушки через 24 ч: температура плиты $+32^{\circ}\text{C}$, температура среды $+25^{\circ}\text{C}$, вакуум 0,05 trr.

После сушки бактерии проверяли на жизнеспособность и сохранность аутентичности заявленным паспортным данным, затем закладывали на хранение в лиофилизированном виде при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ и через 5 лет определяли жизнеспособность и сохранность биологических свойств [30].

Параллельно поддерживали культуру штамма в нативном виде с пересевами через 28–30 дней на МПГА и сравнительной проверкой биологических свойств один раз в год.

В результате проведенной работы по хранению штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) в течение 5 лет с использованием усовершенствованной системы его поддержания было установлено, что он сохраняет свою жизнеспособность, при этом исключается утрата или изменение его морфологических, биохимических, серологических и вирулентных свойств.

Таким образом, усовершенствованная система поддержания производственного штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) включает этапы, представленные в таблице 2.

Применение метода лиофилизации позволило увеличить сроки хранения штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) и обеспечить стабильность его биологических свойств в течение всего срока хранения.

Кроме того, сублимационная сушка позволила проводить пассаж штамма на чувствительных лабораторных животных один раз в 5 лет, что более выгодно и безопасно с экономической и биологической точек зрения.

Вся работа, проводимая со штаммами возбудителей I–II групп патогенности (опасности), представляет собой угрозу потенциального выделения патогенного биологического агента в воздух производственной зоны, среду обитания человека и заражения персонала. Для этого должны быть разработаны надежные методы их инактивации. В нашем случае был применен метод гамма-облучения. При этом определили оптимальную дозу, составившую 30 кГр, которая позволила надежно инактивировать штамм и сохранить структурную целостность бактериальных клеток, являющихся антигеном для получения гипериммунных сывороток и постановки серологических реакций.

Таким образом, усовершенствованная система поддержания штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed) отвечает современным требованиям, предъявляемым к хранению коллекционного фонда возбудителей особо опасных болезней в течение длительного времени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы была усовершенствована система поддержания производственного штамма *Burkholderia mallei* 5584 (Master seed), обеспечивающая сохранение его биологических свойств, необходимых для производства качественных сапных диагностикумов, используемых при проведении ежегодных диагностических исследований для своевременного выявления больных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мельникова Л. А., Букова Н. К., Макаев Х. Н., Иванова С. В., Мустафина Э. Н., Савкова М. Г. Сап: особо опасное инфекционное заболевание, его характеристика, эпизоотология и диагностика. *Ветеринарный врач*. 2016; 4: 22–25. EDN: WHTGVJ
2. Букова Н. К., Скляров О. Д., Бабичева О. В. Сап: ретроспектива и перспективы создания вакцины. *Ветеринария*. 2020; 10: 3–8. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.10.03-08>
3. Sarkar-Tyson M., Titball R. W. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* In: *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*. Ed. by A. D. T. Barrett, L. R. Stanberry. Academic Press; 2009; Chapter 43: 831–843. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369408-9.00043-3>
4. Inglis T. J. J., Merritt A. J. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. In: *Molecular Medical Microbiology*. Ed. by Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, J. Schwartzman. 2nd ed. Academic Press; 2015; Chapter 42: 769–791. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00042-1>
5. Ряпис Л. А., Илюхин В. И., Сенина Т. В., Шубникова Е. В., Будченко А. А., Куликова А. С. Сравнительная характеристика буркхолдерий группы *pseudomallei*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013; 90 (1): 3–8. EDN: QAYELT
6. Молчанова Е. В., Агеева Н. П. Научно-методические аспекты совершенствования деятельности коллекции патогенных микроорганизмов Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 95 (3): 117–126. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-3-117-126>
7. Ветчинин С. С., Щит И. Ю., Шевяков А. Г., Бикетов С. Ф. Возможность выявления штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза при сочетании методов иммуноблоттинга и амплификации ДНК. *Инфекция и иммунитет*. 2019; 9 (2): 404–408. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-2-404-408>
8. Букова Н. К., Скляров О. Д., Юров К. П., Мельникова Л. А. Неспецифические реакции при диагностике сапа лошадей. *Ветеринария*. 2009; 9: 21–24. EDN: KXURCR
9. Erdemsurakh O., Ochirbat K., Gombosuren U., Tserendorj B., Purevdorj B., Vanaabaatar B., et al. Seroprevalence of equine glanders in horses in the central and eastern parts of Mongolia. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2020; 82 (9): 1247–1252. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0219>
10. Захарова И. Б., Топорков А. В., Викторов Д. В. Мелиоидоз и сап: современное состояние проблемы и актуальные вопросы эпидемиологического надзора. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 95 (6): 103–109. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-103-109>
11. Khan I., Wieler L. H., Melzer F., Elschner M. C., Muhammad G., Ali S., et al. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2013; 60 (3): 204–221. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01342.x>
12. Falcão M. V. D., Silveira P. P. M., Santana V. L. A., da Rocha L. O., Chaves K. P., Mota R. A. First record of *Burkholderia mallei* Turkey 10 strain originating from glanders horses from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2019; 50 (4): 1125–1127. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00113-2>
13. Shakibamehr N., Mosavari N., Harzandi N., Mojgani N. Designing of Western blot technique for glanders diagnosing in Iran. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2021; 99:103403. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103403>
14. Singha H., Elschner M. C., Malik P., Saini S., Tripathi B. N., Mertens-Scholz K., et al. Molecular typing of *Burkholderia mallei* isolates from equids with glanders, India. *Emerging Infectious Diseases*. 2021; 27 (6): 1745–1748. <https://doi.org/10.3201/eid2706.203232>

15. Похиленко В. Д., Баранов А. М., Детушев К. В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2009; 4: 99–121. EDN: LAKPFX
 16. Утепешева Л. А. Влияние условий хранения на выживаемость коллекционных бактериальных штаммов. *ЭкоБиоТех 2019: материалы VI Всероссийской конференции с международным участием (Уфа, 1–4 октября 2019 г.)*. Уфа: Уфимский институт биологии; 2019; 318–322. EDN: LIYOZC
 17. Охупкина В. Ю. Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лиофилизация. *Теоретическая и прикладная экология*. 2009; 4: 21–32. EDN: KZTIUJ
 18. Мельникова Л., Иванова С., Галиуллин А., Макаев Х. Определение жизнеспособности и сохранность биологических свойств штаммов возбудителя сапа при длительном хранении. *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. 2019; 2: 60–63. EDN: EOHRGG
 19. Дятлов И. А. Коллекции патогенных микроорганизмов – значение и проблемы. *Бактериология*. 2018; 3 (1): 5–6. EDN: XZFBUL
 20. Грачева И. В., Осин А. В., Кутырев В. В. Принципы формирования коллекционных фондов штаммов микроорганизмов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; (2): 16–23. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-16-23>
 21. Smith D. Culture collections. In: *Advances in Applied Microbiology*. Ed. by S. Sariaslani, G. M. Gadd. 2012; 79 (Chapter 4): 73–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394318-7.00004-8>
 22. Букова Н. К. Сап: разработка, изготовление, контроль и стандартизация диагностикомов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.; 1999. 40 с.
 23. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. Под ред. М. О. Биргера. М.: Медицина; 1982. 464 с.
 24. Старовойтова С. А., Скродская О. И. Пробиотики на основе трансгенных микроорганизмов. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6 (1): 34–45. EDN: PZMRKZ
 25. Антонов В. А., Илюхин В. И. Молекулярно-биологические подходы к диагностике и внутривидовому типированию возбудителей сапа и мелиоидоза. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2005; (2): 3–9. EDN: GYFPMI
 26. Артемьева Е. А., Мельникова Л. А., Родионов А. П. Особенности подготовки и выдачи производственного штамма 5584 *Burkholderia mallei* в соответствии с требованиями биологической безопасности. *Ветеринария сегодня*. 2021; 10 (3): 243–247. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2021-3-38-243-247>
 27. Охупкина В. Ю., Пяткова Н. В., Барамзина Г. В., Фоменков О. О., Федотов А. К. Опыт длительного хранения штаммов возбудителя туляремии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; (4): 69–74. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-4-69-74>
 28. Инструкция по лиофильному высушиванию возбудителей инфекционных заболеваний I–IV групп на коллекторном аппарате системы К. Е. Долинова от 21 марта 1979 г. МЗ СССР, 1979.
 29. Червякова Н. С., Валова Т. В., Осин А. В. Использование лиофильных аппаратов камерного типа в коллекциях патогенных микроорганизмов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; (3): 65–68. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2014-3-65-68>
 30. Мельникова Л. А., Иванова С. В., Макаев Х. Н., Букова Н. К. Влияние сред высушивания на устойчивость возбудителя сапа в процессе лиофилизации и дальнейшем хранении. *Ветеринарный врач*. 2017; 3: 17–20. EDN: YRWHL
- ## REFERENCES
1. Melnikova L. A., Bukova N. K., Makaev Kh. N., Ivanova S. V., Mustafina I. N., Savkova M. G. Glanders – particularly dangerous disease: characterization, epizootology and detection. *Veterinarian*. 2016; 4: 22–25. EDN: WHTGVJ (in Russ.)
 2. Bukova N. K., Sklyarov O. D., Babicheva O. V. Glanders: lookback study and vaccine's creation current prospects. *Veterinariya*. 2020; 10: 3–8. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.10.03-08> (in Russ.)
 3. Sarkar-Tyson M., Titball R. W. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* In: *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*. Ed. by A. D. T. Barrett, L. R. Stanberry. Academic Press; 2009; Chapter 43: 831–843. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369408-9.00043-3>
 4. Inglis T. J. J., Merritt A. J. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. In: *Molecular Medical Microbiology*. Ed. by Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, J. Schwartzman. 2nd ed. Academic Press; 2015; Chapter 42: 769–791. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00042-1>
 5. Ryapis L. A., Ilyukhin V. I., Senina T. V., Shubnikova E. V., Budchenko A. A., Kulikova A. S. Comparative characteristic of *Burkholderia pseudomallei* group. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2013; 90 (1): 3–8. EDN: QAYELT (in Russ.)
 6. Molchanova E. V., Ageeva N. P. Scientific and methodological support for development of pathogenic microorganism collection of Volgograd Research Institute for Plague Control. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018; 95 (3): 117–126. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-3-117-126> (in Russ.)
 7. Vetchinin S. S., Shchit I. Y., Shevyakov A. G., Biketov S. F. The possibility of identifying individual strains of glanders and melioidosis pathogens with a combination of immunoblotting and DNA amplification methods. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2019; 9 (2): 404–408. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-2-404-408> (in Russ.)
 8. Bukova N. K., Scljarov O. D., Yurov K. P., Melnikova L. A. The problem of nonspecific reactions in diagnostic of glanders in horses. *Veterinariya*. 2009; 9: 21–24. EDN: KXURCR (in Russ.)
 9. Erdemsurakh O., Ochirbat K., Gombosuren U., Tserendorj B., Purevdorj B., Vanaabaatar B., et al. Seroprevalence of equine glanders in horses in the central and eastern parts of Mongolia. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2020; 82 (9): 1247–1252. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0219>
 10. Zakharova I. B., Toporkov A. V., Viktorov D. V. Melioidosis and glanders: current state and actual issues of epidemiological surveillance. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018; 95 (6): 103–109. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-103-109> (in Russ.)
 11. Khan I., Wieler L. H., Melzer F., Elschner M. C., Muhammad G., Ali S., et al. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2013; 60 (3): 204–221. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01342.x>
 12. Falcão M. V. D., Silveira P. P. M., Santana V. L. A., da Rocha L. O., Chaves K. P., Mota R. A. First record of *Burkholderia mallei* Turkey 10 strain originating from glanderous horses from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2019; 50 (4): 1125–1127. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00113-2>
 13. Shakibamehr N., Mosavari N., Harzandi N., Mojgani N. Designing of Western blot technique for glanders diagnosing in Iran. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2021; 99:103403. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103403>
 14. Singha H., Elschner M. C., Malik P., Saini S., Tripathi B. N., Mertens-Scholz K., et al. Molecular typing of *Burkholderia mallei* isolates from equids with glanders, India. *Emerging Infectious Diseases*. 2021; 27 (6): 1745–1748. <https://doi.org/10.3201/eid2706.203232>
 15. Pohilenko V. D., Baranov A. M., Detushev K. V. Methods for long-term storage of collection cultures of microorganisms and trends of the development. *University Proceedings. Volga Region. Medical Sciences*. 2009; 4: 99–121. EDN: LAKPFX (in Russ.)
 16. Utepesheva A. A. Influence of storage conditions on survivability of collectible bacterial strains. *EcoBioTech 2019: Proceedings of the VIth All-Russian Conference with international participation (Ufa, October 1–4, 2019)*. Ufa: Ufa Institute of Biology; 2019; 318–322. EDN: LIYOZC (in Russ.)
 17. Okhapkina V. Yu. Methods of microbe cultures maintenance. Part 2. Liophilisation. *Theoretical and Applied Ecology*. 2009; 4: 21–32. EDN: KZTIUJ (in Russ.)
 18. Melnikova L., Ivanova S., Galiullin A., Makaev Kh. The determination of the viability and safety of biological properties of strains of the glanders agent during long-term storage. *Veterinariya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh*. 2019; 2: 60–63. EDN: EOHRGG (in Russ.)
 19. Dyatlov I. A. Problems of pathogenic microorganisms collections. *Bacteriology*. 2018; 3 (1): 5–6. EDN: XZFBUL (in Russ.)
 20. Gracheva I. V., Osin A. V., Kutyrev V. V. Principles of formation of collection funds of microorganism strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021; (2): 16–23. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-16-23> (in Russ.)
 21. Smith D. Culture collections. In: *Advances in Applied Microbiology*. Ed. by S. Sariaslani, G. M. Gadd. 2012; 79 (Chapter 4): 73–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394318-7.00004-8>
 22. Bukova N. K. Glanders: development, production, control and standardization of diagnostic agents: Author's abstract of Thesis for degree of Dr. Sci. (Biology). Moscow; 1999. 40 p. (in Russ.)
 23. Manual for microbiological and virological test methods. Ed. by M. O. Birger. Moscow: Meditsina; 1982. 464 p. (in Russ.)
 24. Starovoitova S. A., Skrotska O. I. Probiotics based on transgenic microorganisms. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6 (1): 34–45. EDN: PZMRKZ (in Russ.)
 25. Antonov V. A., Ilyukhin V. I. Molecular-genetic approaches to diagnosis and intraspecific typing of causative agents of glanders and melioidosis. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2005; (2): 3–9. PMID: 15954468 (in Russ.)
 26. Artemeva E. A., Melnikova L. A., Rodionov A. P. Preparation and transfer of *Burkholderia mallei* production strain 5584 in accordance with the biosafety requirements. *Veterinary Science Today*. 2021; 10 (3): 243–247. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2021-3-38-243-247>
 27. Okhapkina V. Yu., Pyatkova N. V., Baramzina G. V., Fomenkov O. O., Fedotov A. K. Long-term storage of tularemia agent strains. *Problems*

of *Particularly Dangerous Infections*. 2018; (4): 69–74. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-4-69-74> (in Russ.)

28. Instructions on freeze-drying of I–IV Class infectious agents using collector-type machine of K. E. Dolinov system, developed on March 21, 1979, USSR Ministry of Health, 1979. (in Russ.)

29. Chervyakova N. S., Valova T. V., Osin A. V. Application of freeze-dryers of chamber type in the collections of pathogenic microorganisms. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2014; (3): 65–68. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2014-3-65-68> (in Russ.)

30. Melnikova L. A., Ivanova S. V., Makaev Kh. N., Bukova N. K. The influence of media on drying stability of the causative agent of glanders in the process of lyophilization and subsequent storage. *Veterinarian*. 2017; 3: 17–20. EDN: YRWHIL (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 30.10.2023

Поступила после рецензирования / Revised 11.12.2023

Принята к публикации / Accepted 23.01.2024

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Артемяева Елена Александровна, канд. вет. наук, начальник отдела – Государственная коллекция микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-6204-6077>, e-mail: artemevaelena21@mail.ru

Мельникова Лилия Арсентьевна, канд. вет. наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела – Государственная коллекция микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-0159-3843>, e-mail: vnivi@mail.ru

Зайнуллин Ленар Ильгизарович, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, ученый секретарь ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3086-4921>, e-mail: lenarilgizayn@mail.ru

Букова Наталья Константиновна, д-р биол. наук, профессор, ученый секретарь ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-5876-6020>, e-mail: bukova@vgnki.ru

Elena A. Artemeva, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Department – State Collection of Microorganisms, Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6204-6077>, e-mail: artemevaelena21@mail.ru

Liliya A. Melnikova, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Department – State Collection of Microorganisms, Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0159-3843>, e-mail: vnivi@mail.ru

Lenar I. Zaynullin, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Scientific Secretary, Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3086-4921>, e-mail: lenarilgizayn@mail.ru

Nataliya K. Bukova, Dr. Sci. (Biology), Professor, Scientific Secretary, The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5876-6020>, e-mail: bukova@vgnki.ru

Вклад авторов: Артемяева Е. А. – статистическая обработка результатов, оформление статьи; Мельникова Л. А. – планирование исследования, проведение экспериментов; Зайнуллин Л. И. – помощь в оформлении статьи; Букова Н. К. – помощь в оформлении статьи.

Contribution: Artemeva E. A. – statistic processing of results, paper preparation; Melnikova L. A. – study design, experimentation; Zaynullin L. I. – assistance in paper preparation; Bukova N. K. – assistance in paper preparation.