

1994. – 60 с.

7. [http:// www.farmweb.org](http://www.farmweb.org).

8. Agerso Y. Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil/ Agerso Y., Sandvang D. // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. - № 71(12).- С. 7941 - 7947.

9. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions / Kuhn I., Iverersen A., Finn M., Greko C. // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2005. - № 71 (9). - С 5383 - 5390.

10. Sapkota A.R. Antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Enterococcus* spp. and *Streptococcus* spp. recovered from the indoor air of a large-scale swine-feeding operation / Sapkota A.R., Ojo K.K., Roberts N // *Letters in Applied Microbiology*. - 2006. - 43(5). - С 534 -540

*В статті зображено дані результатів санітарно-мікробіологічного дослідження проб ґрунту, води та повітря, отриманих на підприємствах з виробництва товарного молока. В результаті експериментальних досліджень було встановлено найбільше кількість в досліджуваних пробах води та ґрунту асоціацій мікроорганізмів *E. coli* і *Enterococcus* spp. Крім того, в досліджуваних с тваринницького об'єкта пробах повітря, ґрунту та води, було встановлено наліччя гемолітичних та антибіотикорезистентних культур *Enterococcus* spp.*

*The article shows the data results of sanitary and microbiological examination of samples of soil, water and air, the selected enterprises with salable milk. Experimental studies found the largest number in the test samples of water and soil associations of microorganisms *E. coli* and *Enterococcus* spp. In addition, the study with the livestock facility samples of air, soil and water, established the presence of hemolytic and antibiotic-resistant crops *Enterococcus* spp.*

Дата надходження в редакцію: 04.03.2013 р.

Рецензент: д.вет.н., професор В. В. Касянчук

УДК 619.5:6616-085.636.5

ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ДІАГНОСТИЧНОЇ КАМПІЛОБАКТЕРІОЗНОЇ АГЛЮТИНУЮЧОЇ СИРОВАТКИ

Т. І. Фотіна, д.вет.н., професор, Сумський НАУ

О. І. Касяненко, к.вет.н., професор, Сумський НАУ

*В статті представлені дані щодо теоретичного і експериментального обґрунтування технології отримання діагностичної кампілобактеріозної аглютинуючої сироватки на основі багаторазової імунізації тварин-продуцентів антигенним матеріалом *S. jejuni* з комбінованим поєднанням препаратів різних груп, що забезпечило підвищення специфічної активності сироваток і отримання високих титрів специфічних антитіл.*

Ключові слова: мікроорганізми, ізоляція, контамінація, препарати, діагностика, діагностична сироватка.

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями. Одним з доступних і простих методів ідентифікації збудників інфекційних захворювань є реакція аглютинації. Ефективність проведення дослідження залежить від специфічності аглютинуючої сироватки, на якість якої впливає схема специфічної імунізації тварин [2, 4, 5].

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми. Існує декілька виробничих штамів, які використовуються в технологічному процесі виготовлення імунобіологічних препаратів: *Campylobacter jejuni* № 11168 (АТСС) Американської колекції штамів мікроорганізмів, *Campylobacter jejuni* 1/НСТС 11168 колекції штамів мікроорганізмів ГНІИСК стандартизації

і контролю медичинських препаратів ім. Л.А. Тарасевича (м. Москва), *Campylobacter jejuni* 33291 – із колекції штамів мікроорганізмів НІИЕМ ім. Н.Ф. Гамалеї РАМН, *Campylobacter jejuni* 1/НСТС 11168 колекції штамів мікроорганізмів ГНІИСК стандартизації і контролю медичинських препаратів ім. Л.А. Тарасевича (м. Москва), *Campylobacter jejuni* 33291 – із колекції штамів мікроорганізмів НІИЕМ ім. Н.Ф. Гамалеї РАМН. Суттєвим недоліком всіх перелічених вище штамів є низький вихід антигенного матеріалу, а отримані кампілобактеріозні моноспецифічні та полігрупові аглютинуючі сироватки для РА дають в низьких титрах перехресні реакції з гетерологічними культурами (сальмонелами, шигелами, стафілококами). Наведені обставини вимагають пошуку штаму *Campylobacter jejuni* для виробництва імунобіологічних препаратів. Нині відомі

способи виготовлення діагностичних кампілобактеріозних моноспецифічних аглютинуючих сироваток до *Campylobacter spp.*, а саме розроблений Всероссийским государственным научно-исследовательским институтом контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов – ВГНКИ (г. Москва). Виготовлення сироваток кампілобактеріозних моноспецифічних аглютинуючих, що регламентується за ОСТ 10 – 19 – 008 – 99 здійснюється імунізацією кролів-продуцентів чотириразово: перші три ін'єкції проводять у суміші рівних частин з адьювантом Фрейнда з інтервалом 7 діб, 4-й раз – через 14 діб. Відбір крові проводять тотальним знекровленням через 2 тижні після заключної ін'єкції. Цей спосіб отримання діагностичних кампілобактеріозних сироваток тривалий, трудомісткий, характеризується високим рівнем відходу тварин-продуцентів, а специфічна активність сироваток є недостатньо високою [3].

Мета і задачі досліджень. Мета досліджень полягала в теоретичному і експериментальному обґрунтуванні технології одержання діагностич-

них кампілобактеріозних аглютинуючих сироваток. Для досягнення мети необхідно було розв'язати такі задачі: розробити спосіб одержання діагностичної сироватки для ідентифікації бактерій роду *Campylobacter* в реакції аглютинації з потенційною можливістю подальшого застосування біологічною промисловістю для виробництва діагностичних гіперімунних кампілобактеріозних сироваток.

Матеріали і методи досліджень. Ізоляти кампілобактерій адаптували до середовища поживного щільного для культивування кампілобактерій (ТУ У 24.4-14332579-056:2010). Рівні накопичення бактеріальної маси досліджуваних штамів визначали у 2-3 генерації.

Як кампілобактерійний антиген використовували бактеріальну масу *C. jejuni* spp. *Jejuni* C.2008 (Депозитарій НЦМ ДНКІБШМ, м. Київ), доведена до концентрації 1×10^9 м.к./мл. Імунізацію кролів для отримання діагностичних кампілобактеріозних аглютинуючих сироваток здійснювали за схемою I (табл. 1).

Таблиця 1

Схема імунізації кролів із застосуванням імуностимулятора "Тимогена", n = 7

Номер ін'єкції	Інтервал між ін'єкціями, діб	Доза антигена, $\times 10^9$ м.к./см ³	Спосіб введення антигена	Імуностимулятор "Тимоген"	
				доза, мкг/кг	спосіб введення
1	–	1,00	в/в	10	в/м
2	7	1,25	в/в	10	в/м
3	7	1,50	в/в	10	в/м
4	7	1,75	в/в	10	в/м
5	7	2,00	в/в	10	в/м

При цьому способі тривалість циклу імунізації становила 35 діб. Після забору крові готували сироватку. Титр Ат сироватки визначали в реакції аглютинації.

Також вивчали схему імунізації (схема II), яка відрізняється тим, що при третій ін'єкції антигена

та імуностимулятора додатково одноразово внутрішньовеново вводили 1 мл тривітаміну виробництва ВАТ "Київський вітамінний завод" (А 10000 МО/см³ \pm 15%; Е 20 мг/см³ \pm 10%; Д₃ 15000 МО/см³ \pm 15%) (табл. 2).

Таблиця 2

Схема імунізації кролів із застосуванням імуностимулятора "Тимоген" та вітамінного препарату "Тривітамін", n = 7

Номер ін'єкції	Інтервал між ін'єкціями, діб	Доза антигену, $\times 10^9$ м.к./см ³	Спосіб введення антигену	Препарати			
				Імуностимулятор "Тимоген"		тривітамін	
				доза, мкг/кг	спосіб введення	доза, мл/гол	спосіб введення
1	–	1,00	в/в	10	в/м		
2	7	1,25	в/в	10	в/м		
3	7	1,50	в/в	10	в/м	1	в/м
4	7	1,75	в/в	10	в/м		
5	7	2,00	в/в	10	в/м		

Результати досліджень. В основу розробки покладено підвищення специфічної активності діагностичних кампілобактеріозних аглютинуючих сироваток. На першому етапі проведено роботу із циркулюючими штамми *C. jejuni*. Вивчили і встановили відповідність ізолятів кампілобактерій вимогам Європейської фармакопеї щодо виробництва імунобіологічних препаратів.

В порівняльному аспекті визначали активність діагностичних сироваток, отриманих за I та II схемою імунізації кролів. Для цього реакцію аглютинації ставили в пробірках в об'ємі 1см³ в

трьох варіантах з різними дозами мікробних клітин у зависі ($1,0 \times 10^9$ м.к./см³, $2,0 \times 10^9$ м.к./см³ та $3,0 \times 10^9$ м.к./см³). Досліджувану сироватку розводили 1:25 (до 1,0 см³ стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду додавали 0,04 см³ сироватки).

У кожену пробірку наливали 0,5 см³ стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду. У першу пробірку додавали 0,5 см³ вихідного розведення сироватки (1:25). Після цього робили двократні послідовні розведення сироватки до 1:12800. До кожного розведення сироватки вно-

сили по 0,5 см³ Аг. Контроль на спонтанну аглютинацію: сироватка без Ат у розведенні 1:25 та стерильний ізотонічний розчин натрію хлориду, сироватка з Ат у розведенні 1:25 та стерильний ізотонічний розчин натрію хлориду, Аг та стерильний ізотонічний розчин натрію хлориду, ізотонічний розчин натрію хлориду. Пробірки витримували 18 годин у термостаті при температурі 37°C, потім – 6-8 годин при кімнатній температурі, після чого проводили облік реакції. Активність гіперімунних сироваток, отриманих за I схемою імунізації, в РА становила 1:1600, а за II схемою – 3200. Слід відзначити, що оптимальна концентрація мікробних клітин у зависі, що використовується як Аг в РА з кампілобактеріозними діагностичними сироватками, дорівнювала 3×10⁹ м.к./см³.

Для одержання діагностичної сироватки кампілобактеріозної поліспецифічної аглютинуючої як корпускулярний кампіло-бактерійний полігруповий антиген використовували об'єднані в рівних пропорціях бактеріальні маси *Campylobacter jejuni* spp. *jejuni* № 478 (Депозитарій НЦМ ДНКІБШМ, м. Київ), *Campylobacter coli* № 43477, *C. fetus* spp. *fetus* № 5396, *Campylobacter lari* № 729 колекції штамів мікроорганізмів ФГУ "ВГНКИ" (м. Москва), оброблені при температурі 100°C протягом однієї години з додавання 1%-го розчину формаліну і доведені до концентрації 1×10⁹ м.к./мл.

Імунізацію кролів-продуцентів виконували в послідовності, описаній в II схемі одержання діагностичної кампілобактеріозної моноспецифічної аглютинуючої сироватки. Поєднання ін'єкцій антигену, імуностимулятора та тривітаміну забезпечило збільшення антитілоутворення у тварин-продуцентів, підвищення специфічної активності сироваток і отримання високих титрів специфічних антитіл – 1:3200-1:6400. При вивченні специфічності використовували комерційні діагностичні аглютинуючі сироватки: сальмонельозну та бруцельозну полівалентну. Досліджувана діагностична сироватка характеризувалася високою специфічністю і із зазначеними вище сироватками реакція аглютинації була негативною. Поєднання імуностимулюючих з вітамінними препаратами є оптимальною комбінацією препаратів різних груп і термінів їх застосування для активації механізмів імунітету.

Спосіб одержання діагностичної кампілобактеріозної сироватки включає: застосування як імуностимулятора тимогену, а в третій ін'єкції – тривітаміну виробництва ВАТ "Київський вітамінний завод" (А 10000 МО/см³ ± 15%; Е 20 мг/см³ ±

10%; Д₃ 15000 МО/см³ ± 15%) сприяє додатковій активації макрофагів, стимуляції фагоцитарної, головним чином Т- і В-лімфоцитів, значному підвищенню титрів специфічних антитіл сироватки за рахунок збільшення числа антитілоутворювальних клітин.

Отже, спосіб одержання діагностичної сироватки кампілобактеріозної аглютинуючої включає: п'ятиразове внутрішнє введення антигенного матеріалу в дозі 1×10⁹ м.к./см³ з поступовим збільшенням антигенного матеріалу на 0,25×10⁹ м.к./см³, застосування імуностимулятора "Тимоген" – внутрішньозово в дозі 10 мкг/кг одночасно з ін'єкцією антигенного матеріалу, а тривітаміну – разово в третій ін'єкції в дозі 1,0 мл/гол.

Отже, одержання діагностичної сироватки кампілобактеріозної аглютинуючої включає п'ятиразову її з інтервалом 7 днів імунізацію тварин-продуцентів антигенним матеріалом з *Campylobacter jejuni* spp. *jejuni* у дозі 1,0 ×10⁹ м.к./мл при поступовому збільшенні дози при кожному введенні на 0,25×10⁹ м.к./мл; комбіноване поєднання імуностимулятора "Тимоген" – внутрішньозово в дозі 10 мкг/кг (одночасно з ін'єкцією антигена), препарату "Тривітамін" – внутрішньозово в дозі 1 мл одноразово в третій ін'єкції; забору крові і приготування сироватки. При цьому способі тривалість циклу імунізації становила 30 днів. За результатами проведених досліджень одержано патент України на корисну модель № 62017 "Штам *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* С.2008 для виготовлення імунобіологічних препаратів" та патент України на корисну модель № 61997 "Спосіб одержання діагностичної сироватки кампілобактеріозної аглютинуючої", від 10.08.2011 р.

Висновки

1. Технології отримання діагностичної кампілобактеріозної аглютинуючої сироватки є ефективнішою за схемою, що включає п'ятикратну з інтервалом 7 днів імунізацію тварин-продуцентів антигенним штамом *C. jejuni* spp. *jejuni* С.2008 у поєднанні з імуностимулятором "Тимогеном" у дозі 10 мкг/кг (одночасно з ін'єкцією антигена), препаратом "Тривітамін" у дозі 1 мл/гол одноразово в третій ін'єкції.

2. Запропонована схема отримання діагностичної кампілобактеріозної аглютинуючої сироватки характеризується високою специфічністю і забезпечує одержання високих титрів специфічних антитіл – 1:3200-1:6400.

Список використаної літератури:

1. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення і підрахунку кампілобактерій (*Campylobacter* spp.). Частина 1. Метод виявлення (ISO 10272-1:2006, IDT) : ДСТУ ISO 10272-1:2007. – [Чинний від 2006-08-03]. – К. : Держспоживстандарт України, 2007 р., 28 с. – (Національний стандарт України).
2. Алиева Е.В. Разработка лабораторных экспресс-методов и технологии производства иммуно-

диагностических препаратов для выявления возбудителей листериоза и кампилобактериоза : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. мед. наук : спец. 03.00.07 «Мікробіологія», 03.00.23 «Біотехнологія» / Е.В. Алиева. – Москва. 2008 – 33 с.

3. Ефимочкина Н.Р. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа : автореф. дис. на соискание научн. степени докт. биол. наук : спец. 14.02.01 «Гигиена» / Н.Р. Ефимочкина. – Москва. 2010 – 48 с.

4. Пат. на корисну модель 62017 Україна, МПК С12N 1/20 (2006/01). Штам *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* С.2008 для виготовлення імунобіологічних препаратів / Фотіна Т.І., Касяненко О.І.; заявник та правовласник Сумський НАУ. – № u 201100255 ; заявл. 10.01.2011 ; опубл. 10.08.2011.

5. Пат. на корисну модель 61997 Україна, МПК (2011) Спосіб одержання діагностичної сироватки кампілобактеріозної аглютинуючої / Фотіна Т.І., Касяненко О.І.; заявник та правовласник Сумський НАУ. – № u 201100025 ; заявл. 04.01.2011 ; опубл. 10.08.2011, Бюл. № 5.

6. The Community summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008 / European Food Safety Authority // The EFSA Journal. – 2010. – № 8(7). – 1658 p.

7. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008 / European Food Safety Authority // The EFSA Journal. – 2010. – № 8 (1). – 1496 p.

*В статье представлены данные относительно теоретического и экспериментального обоснования технологии получения диагностической кампилобактериозной агглютинирующей сыворотки на основе многоразовой иммунизации животных-производителей антигенным материалом *C. jejuni* с комбинированным сочетанием препаратов разных групп, что обеспечило повышение специфической активности сывороток и получение высоких титров специфических антител.*

*In the articles presented information is in relation to the theoretical and experimental ground of technology of receipt of diagnostic *Campylobacter* agglutinating serum on the basis of multiple immunization of tvarin-producer by antigen material of *C. jejuni* with the combined combination of preparations of different groups, that provided the increase of specific activity of wheys receipt of high titles of specific antibodies.*

Дата надходження в редакцію: 04.03.2013 р.

Рецензент: д.вет.н., професор В. В. Касянчук

УДК 637.075:579.842.1/2

ХАРАКТЕРИСТИКА СТУПЕНІВ РИЗИКУ СТОСОВНО БАКТЕРІЙ ENTEROBACTER SAKAZAKII В МОЛОЦІ КОРІВ ПІСЛЯ ПАСТЕРИЗАЦІЇ

О. М. Бергілевич, д.вет.н., доцент, Сумський НАУ

В. В. Касянчук, д.вет.н., професор, Сумський НАУ

*У статті наведено методологію встановлення та характеристику ступенів ризику стосовно бактерій *Enterobacter sakazakii* в молоці корів гатунку екстра. Встановлено, що ступені ризику стосовно цих бактерій характеризуються як «низький», «середній», «високий» і залежать від початкового рівня контамінування сирого молока цими мікроорганізмами та мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae*, а також режимів пастеризації молока.*

Ключові слова: оцінка мікробіологічного ризику, ступені ризику, бактерій *Enterobacter sakazakii*, мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae*, режими пастеризації.

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими та практичними завданнями. У молоці та молочних продуктах ризику найчастіше пов'язані з мікроорганізмами. Оскільки мікробіологічні ризику є найбільш важливими з поміж інших небезпек, таких як хімічні та фізичні, то їм у харчовому законодавстві приділяється особлива увага [1,2,3]. Оцінка мікробіологічного ризику (ОМР) спрямована на вирішення тих проблем, які становлять найбільшу загрозу для здоров'я людини при вжи-

ванні харчових продуктів. ОМР необхідно проводити на науковій основі, а за результатами цієї оцінки здійснюються активні управлінські заходи [4,5,6].

Наукова ОМР стосовно нових та маловивчених мікроорганізмів – це ключ для вдосконалення тветеринарно-санітарного контролю та запровадження адекватних санітарно-гігієнічних заходів під час виробництва харчових продуктів [1,2,7,8]. На жаль, на даний час в Україні не використовується такий новий міжнародний методологічний