

19. A Real-Time PCR Assay for the Detection of Atypical Strains of Chlamydiaceae from Pigeons / A. Zocovic, F. Vorimore, N. Vicari, J. Gasparini, L. Jacquin, K. Sachse, S. Magnino, K. Laroucau // PLOS One. – 2013. – Vol. 8 (3). – P. 1-5.

20. Molecular characterization of atypical Chlamydia and evidence of their dissemination in different European and Asian chicken flocks by specific real-time PCR / A. Zocovic, F. Vorimore, C. Marhold, D. Horvatek, D. Wang, B. Slavec, Z. Prentza, G. Stavianis, E. Prukner-Radovic, A. Dovc, V. Siarkou, K. Laroucau. // Environmental Microbiology. – 2012. – Vol. 14 (8). – P. 2212-2222.

21. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies / R. Ehrlich, P. Slickers, S. Goellner, H. Hotzel, K. Sachse // Molecular and Cellular Probes. – 2006. Vol. 20(1). – P. 60-63.

22. DNA microarray-based detection and identification of Chlamydia and Chlamydophila spp. / K. Sachse, H. Hotzel, P. Slickers, T. Ellinger, R. Ehrlich // Molecular and Cellular Probes. – 2005. – Vol. 19. – P. 41-50.

Романишина Ю. Р., Скрипник В. Г., Скрипник А. В. Идентификация нового вида хламидий на Украине?

Описан первый случай идентификации *Chlamydia gallinacea* у домашней птицы на территории Украины. С помощью ПЦР в реальном времени и метода ДНК-чипов была выделена ДНК возбудителя с клоакальных соскобов 7 индюков. Установлен тот факт, что геном *C. gallinacea*, идентифицированный от птицы в Украине имеет некоторые отличия от штаммов, которые были выделены в других странах.

Ключевые слова: хламидиоз, *Chlamydia gallinacea*, индюки, ПЦР в реальном времени, ДНК-чипы.

Romanyshyna Yu, Skrypnyk V., Skrypnyk A. Identification of a novel Chlamydia species in Ukraine?

The first case of identification of *Chlamydia gallinacea* in poultry in Ukraine was described. The pathogen was detected from 7 cloacal scrapings of turkeys by using Real-time polymerase chain reaction and DNA microarray technology. It was established the fact that the genome of *C. gallinacea* identified in Ukrainian poultry has certain differences compared with the genomes of strains that were isolated in other countries.

Keywords: chlamydiosis, *Chlamydia gallinacea*, turkeys, Real-time PCR, DNA microarrays.

Рецензент: д.вет.н., професор Стегній Б.Т.
Дата надходження до редакції: 02.12.2015 р.

УДК 636.09:616–092.4:579.86

ВИЯВЛЕННЯ КОАГУЛАЗНОЇ АКТИВНОСТІ В ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE

Н. Г. Пінчук, к.вет.н., Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

К. Ю. Колеснікова, к.вет.н., Херсонське державне підприємство – біологічна фабрика

Встановлено, що 33 культури збудника бешихи свиней (94,3 %) з 35 досліджуваних, володіли коагулазною активністю. Результати досліджень свідчать про відсутність залежності між активністю коагулази, серотиповою належністю і ступенем вірулентності ізолятів, виділених з різних регіонів України, та штамів мікроорганізмів, які були отримані із Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Ключові слова: збудник бешихи свиней, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, коагулазна активність, ізоляти, плазма крові, штами.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Бешиха свиней (*Erysipelas suum*) – одне з найбільш поширених і небезпечних захворювань, переважно свиней у віці від 3 до 12 місяців, яке характеризується при гострому і підгострому перебігах септицемією, запальною еритемою шкіряного покриву, гастроентеритом і гіперплазією селезінки, а при хронічному – дерматитом, бородавчастим або виразковим ендокардитом і серозно-фібринозними артритамі.

Окрім свиней, хворіють велика та дрібна рогата худоба, коні, північні олені, багато диких ссавців, домашні та дикі птахи. Серед домашніх та диких тварин, птахів і, особливо, гризунів широко розповсюджено мікробносієство. Збудника бешихи часто виявляють в організмі морських та річкових риб, дельфінів, комах і членистоногих. Хворіє бешихою і людина.

Джерелом інфекції можуть бути і клінічно здорові свині. На основі цього, носійство бактерій

E. rhusiopathiae здоровими свинями необхідно розглядати як латентну інфекцію, при якій організм своїми захисними біологічними реакціями обмежує можливість проникнення бактерій в кровоносне русло і внутрішні органи. Проте, такий стан не стійкий: він може перейти у безсимптомне перехворювання, при якому тварина набуває імунітет або, при неблагоприємних умовах, які послаблюють резистентність організму, бактерії можуть активізуватися, вийти за межі первинного джерела і викликати захворювання з клінічними ознаками.

Захворюваність свиней на бешиху коливається в межах 20-30 %, летальність – 55-80 %.

E. rhusiopathiae відносять до убіквітарних мікроорганізмів, які в залежності від умов знаходження, можуть мати неоднакові морфологічні, вірулентні, антигенні та імуногенні властивості.

Не дивлячись на те, що збудник бешихи свиней належить до числа мікроорганізмів, які легко виділяти та ідентифікувати, без використання складних діагностичних засобів та методик, питання про патогенність *Erysipelothrix rhusiopathiae* та наявність факторів патогенності, які приймають участь у механізмах виникнення і розвитку патологічних процесів, залишається важливим та актуальним питанням.

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання проблеми. *Erysipelothrix rhusiopathiae* неоднорідний за здатністю до утворення токсинів, ферментів та інших факторів патогенності [1].

Коагулазна активність найчастіше асоціюється із патогенними стафілококами чи ерсиніями і, зазвичай, не розглядається як властивість *Erysipelothrix rhusiopathiae* [2-5].

Результати досліджень М.Н. Chang та Х.Ф. Wu [6], свідчать про наявність коагулазної активності в *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Раніше, у досліджах Р. Nikolov [7] також було показано наявність коагулазної активності в *Erysipelothrix rhusiopathiae*, яка є непрямою ознакою патогенності збудника бешихи свиней.

Коагулаза – фермент бактерій, який в поєднанні з деякими компонентами сироватки коагулює плазму. Завдяки коагулазі навколо уражень, викликаних патогенним мікроорганізмом, утворюється фібринозний бар'єр, який полегшує персистенцію бактерій в тканинах, крім того, відкладання фібрину на поверхні бактеріальних клітин ускладнює їх фагоцитоз [2].

Літературні дані свідчать [8-10], що коагулаза може корелювати з вірулентністю *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Ці актуальні питання і визначили вибір напрямів наших досліджень та методи виконання роботи.

Метою даної роботи було вивчити коагулазну активність *Erysipelothrix rhusiopathiae*,

виділених з різних регіонів України та встановити залежність між активністю коагулази, серотиповою належністю та ступенем вірулентності ізолятів.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для дослідження були 25 ізолятів збудника бешихи свиней, виділені з патологічного матеріалу загиблих свиней з різних регіонів України, а також 10 штамів *Erysipelothrix rhusiopathiae* (№ 27, 93, 149, 251, 419, 1689, 1893, 1933, М-2, «Севастопіль»), які були отримані із Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Для виявлення коагулазної активності в збудника бешихи свиней використовували ліофілізовану кролячу (*Rabbit plasma with EDTA*, виробництва Merck, Німеччина) та бичачу плазму, отриману від клінічно здорових тварин, що утримувалися на «Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика», м. Херсон. Кров від тварин відбирали з дотриманням правил асептики та стабілізували за допомогою 4% цитрату натрію. Отримання плазми проводили після відстоювання відібраної крові впродовж 12-14 годин в умовах холодильника за температури $(4,0 \pm 2,0)^{\circ} \text{C}$. Після чого, отриману плазму розливали по 0,5 см³ в стерильні пробірки, які перед стерилізацією дуже ретельно були вимиті, оскільки залишки хімічних речовин можуть впливати на результат плазмокоагуляції.

Усі досліджувані культури *Erysipelothrix rhusiopathiae* культивували на кров'яному агарі впродовж 24-48 годин за температури $36,7 \pm 0,3^{\circ} \text{C}$ з наступним відбором типових колоній S-форми і посівом їх в рідке живильне середовище (МПБ Хоттінгера, збагачений 10 % інактивованої сироватки крові коня). Ріст на кров'яному агарі супроводжувався вузькою зоною α -гемолізу навколо колоній збудника бешихи свиней. В експерименті були використані бульйонні культури *Erysipelothrix rhusiopathiae* з концентрацією не нижче 10^8 - 10^9 КУО/см³, оскільки в суспензіях з концентрацією нижче 10^8 КУО/см³ коагулазна активність може бути не виявлена.

Бульйонні культури *Erysipelothrix rhusiopathiae* вносили піпеткою по 0,5 см³ в пробірки з 0,5 см³ кролячої та бичої плазми. Як позитивний контроль при вивченні коагулазної активності *Erysipelothrix rhusiopathiae* був використаний *Staphylococcus aureus* ATCC № 25923, в якості негативного – *Staphylococcus epidermidis* 14990, *Corynebacterium xerosis* 1911, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112. Пробірки з досліджуваними культурами витримували в термостаті за температури $36,7 \pm 0,3^{\circ} \text{C}$ впродовж доби (24 години). Врахування результатів досліджень проводили двічі: через 2-3 години та через 24 години; враховували наявність/відсутність звертання плазми та утворення згустків.

- За ступенем коагуляції розрізняли:
- ✓ повна відсутність формування згустку;
 - ✓ часткове або неповне формування згустку;
 - ✓ повне формування згустку.

Крім того, з метою виключення самокоагуляції, по 5 пробірок з кролячою та бичачою плазмою, не засіяних досліджуваними культурами бактерій, було витримано в термостаті за температури $(36,7 \pm 0,3)^\circ\text{C}$ впродовж терміну проведення досліджу (24 години).

Вірулентність культур *Erysipelothrix rhusiopathiae* оцінювали по 50 % летальній дозі для білих мишей. Визначення LD_{50} проводили за методом Кербера в модифікації Ашмарина [11].

Визначення серотипової належності *Erysipelothrix rhusiopathiae*, виділених з різних регіонів України, проводили методом преципітації в агаровому гелі з типоспецифічними кролячими сироватками та антигеном. Досліджувані антигени відносили до того серотипу, із сироваткою яко-

го вони давали лінію преципітації. Якщо антиген реагував із сироватками двох підтипів в межах одного серотипу, то позначали як 1a+1b або 2a+2b, а в подальшому як штами 1 або 2 серотипу, без уточнення підтипу.

Відсутність лінії преципітації, а також преципітацію між сироватками розглядали як негативний результат.

Результати власних досліджень. Серотипову належність визначили у 25 ізолятів збудника бешихи свиней, виділених з патологічного матеріалу загиблих свиней з різних регіонів України, а також 10 штамів *Erysipelothrix rhusiopathiae* (№ 27, 93, 149, 251, 419, 1689, 1893, 1933, М-2, «Севастопіль»), які були отримані із Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Отримані результати представлені на рисунку 1.

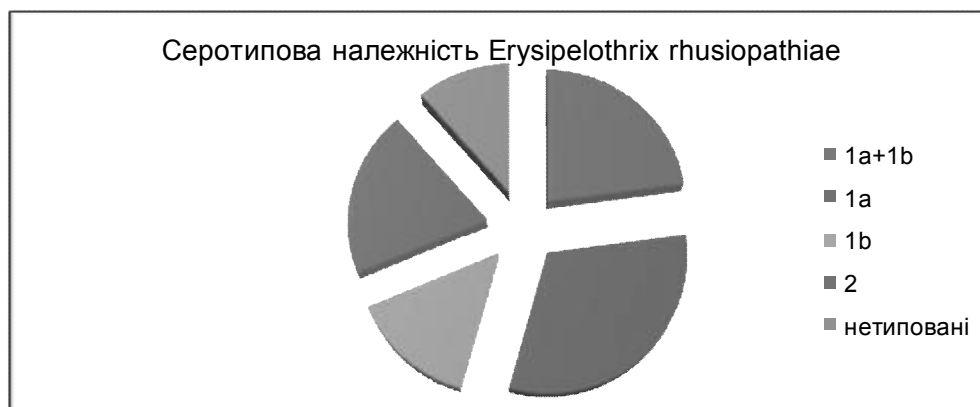


Рис. 1. Серотипова належність культур *Erysipelothrix rhusiopathiae*, виділених з патологічного матеріалу загиблих свиней з різних регіонів України

За результатами проведених досліджень встановлено, що більшість культур *Erysipelothrix rhusiopathiae* належали до серотипу 1a (11 культур), домінуюче положення займали культури серотипу 1a+1b (8 культур). П'ять культур було віднесено до серотипу 1b, сім – серотипу 2 та чотири не типувались.

Ступінь вірулентності є однією з ознак, яка дозволяє диференціювати штами та ізоляти збудника бешихи свиней та умовно розділяти їх на 4 групи:

- високо вірулентні – LD_{50} становить до 100 КУО/тварину (білу мишу);
- середньо вірулентні – LD_{50} становить до 10000 КУО/тварину (білу мишу);
- слабо вірулентні – LD_{50} становить більше 10000 КУО/тварину (білу мишу);

- авірулентні.

У результаті проведених досліджень встановлено, що до групи високо вірулентних штамів належали музейні штами *Erysipelothrix rhusiopathiae* № 149 (LD_{50} для білих мишей становила $100,0 \pm 16,0$ КУО/тварину) та «Севастопіль» (LD_{50} – $46,0 \pm 24,0$ КУО/тварину) та 3 ізоляти, виділені з патологічного матеріалу загиблих свиней (LD_{50} для білих мишей становила $87,0 \pm 19,0$; $105,0 \pm 23,0$ та $94,0 \pm 21,0$ КУО/тварину).

Дещо нижча вірулентність виявлена у 19 культур збудника бешихи свиней (в середньому від 870,0 КУО/тварину до $11349,0 \pm 24,0$ КУО/тварину); інші 11 культур *Erysipelothrix rhusiopathiae* за ступенем вірулентності було віднесено до слабо вірулентних (рис. 2).

Ступінь вірулентності штамів та ізс бешихи свиней

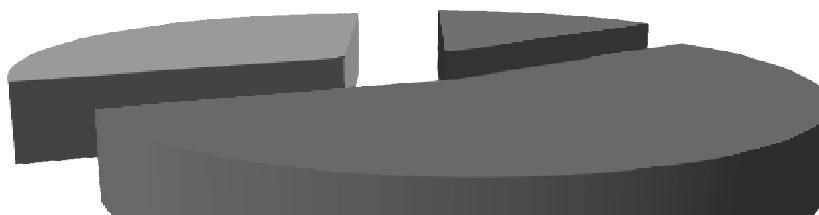


Рис. 2. Показники ступеня вірулентності досліджуваних культур *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Результати проведеного експерименту з виявлення коагулазної активності в *Erysipelothrix rhusiopathiae* свідчать про наявність в 33 культурах (94,3 %) коагулазної активності, з них: у 28 культур через 24 години відмічено повне фор-

мування згустку, в той час як у решти – часткове. Різниця в прояві інтенсивності формування згустку при використанні кролячої та бичачої плазми не було відмічено. Результати досліджень представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати досліджень коагулазної активності в *Erysipelothrix rhusiopathiae*

№ п/п	Ступінь коагуляції через 24 години	Кроляча плазма	Бичача плазма
1.	Повна відсутність формування згустку	у 2 культур	у 2 культур
2.	Часткове або неповне формування згустку	у 5 культур	у 5 культур
3.	Повне формування згустку	у 28 культур	у 28 культур
4.	Позитивний контроль <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC № 25923	+	+
		(повне формування згустку)	(повне формування згустку)
5.	Негативний контроль <i>Staphylococcus epidermidis</i> 14990 <i>Corynebacterium xerosis</i> 1911 <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19112	-	-
		(повна відсутність формування згустку)	(повна відсутність формування згустку)

Залежності між активністю коагулази, серотиповою належністю та ступенем вірулентності ізолятів не було встановлено; оскільки 2 культури *Erysipelothrix rhusiopathiae*, у яких виявлено відсутність коагулазної активності належали до різних серотипів – 1a+1b та 2 і були середньо вірулентними (LD_{50} – $6730,0 \pm 19,0$ КУО/тварину та $11349,0 \pm 24,0$ КУО/тварину відповідно).

Зважаючи на результати досліджень, вважаємо, що питання залежності між активністю коагулази, серотиповою належністю та ступенем вірулентності культур потребує подальшого вивчення.

Висновки. 1. Встановлено, що 33 культури збудника бешихи свиней (94,3 %) з 35 досліджуваних, володіли коагулазною активністю.

2. Залежності між активністю коагулази, серотиповою належністю і ступенем вірулентності ізолятів, виділених з різних регіонів України, та штамів мікроорганізмів не було виявлено.

3. Визначено серотипову належність 35 культур збудника бешихи свиней і встановлено, що 11 культур належали до серотипу 1a; домінуюче положення займали культури серотипу 1a+1b (8); п'ять культур було віднесено до серотипу 1b; сім – серотипу 2 та чотири не типувались.

4. Визначено LD_{50} досліджуваних культур *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Культури, що володіли високою вірулентністю для білих мишей можуть використовуватись в якості контрольних заражаючих при дослідженні імуногенності та протективних властивостей вакцин живих та інактивованих проти бешихи свиней.

Перспективи подальших досліджень полягають у більш глибокому вивченні ролі коагулази в патогенезі захворювання, викликаного *Erysipelothrix rhusiopathiae* та залежності між активністю коагулази, серотиповою належністю і ступенем вірулентності збудника бешихи свиней.

Список використаної літератури:

1. Wood R.L. Erysipelas / In Diseases of swine 8th ed. / B.E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling et al. – Iowa State University Press, Ames, 1999. – P. 419–430.
2. MacFadden, J. F. 1976. Biochemical tests for identification of medical bacteria, p. 41-52. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
3. Morse, S.I. 1980. Staphylococci, p. 623-633. In B.D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen, and H. S.

Ginsberg (ed.), Microbiology, 3rd ed. Harper & Row, Publishers, Inc., New York.

4. Sonnenwirth A.C., and M.N. Swartz. 1980. Yersinia, Francisella, Pasteurella, and Brucella, p. 679-692. In B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen, and H. S. Ginsberg (ed.), Microbiology, 3rd ed. Harper & Row, Publishers, Inc., New York.

5. Wood, R.L. 1986. Erysipelas, p. 571-583. In A. D. Leman, B. Straw, R. D. Glock, W. L. Mengeling, R. H. C. Penny, and E. Scholl (ed.), Diseases of swine, 6th ed. Iowa State University Press, Ames.

6. Wu, X. F. 1984. A further probing test of the blood coagulase of Erysipelothrix rhusiopathiae. J. Vet. Sci. Technol. 5:7-10. (In Chinese.) [Index Vet. 53:260, 1985]

7. Nikolov, P. 1969. Plasma coagulase activity of Erysipelothrix insidiosa. II Kongress Mikrobiol. Bulg. Rezumeta Dakl., p. 86-87. (In Bulgarian.) [Index Vet. 38(2):66, 1970]

8. Erysipelothrix In: Manual of clinical microbiology, 4th ed. / R.E. Weaver, E.H. Lennette. A. Balows, W.J. Hausler et al. – American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1985. – P. 209-221.

9. Shimoji Y. Pathogenicity of Erysipelothrix rhusiopathiae: virulence factors and protective immunity / Shimoji Y. // Microb. Infect. – 2000. – Vol.2, № 8. – P. 965-972.

10. Черкасов В.А. Патогенез и диагностика рожистой инфекции / Черкасов В.А. – Воронеж, 1986. – 158 с.

11. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / Ашмарин И.П., Воробьев А.А. – Л., 1962. – С. 34-46.

Пинчук Н. Г., Колесникова К. Ю. Обнаружение коагулазной активности в Erysipelothrix rhusiopathiae.

Установлено, что 33 культуры возбудителя рожи свиней (94,3 %) с 35 исследованных, характеризовались коагулазной активностью. Результаты исследований свидетельствуют об отсутствии зависимости между активностью коагулазы, серотиповой принадлежностью и степенью вирулентности изолятов, выделенных с различных регионов Украины, и штаммов микроорганизмов, которые были получены из Национального центра штаммов микроорганизмов Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов.

Ключевые слова: возбудитель рожи свиней, Erysipelothrix rhusiopathiae, коагулазная активность, изоляты, плазма крови, штаммы.

Pinchuk N. G., Kolesnikova K. Yu. Definition of coagulase activity in Erysipelothrix rhusiopathiae.

Found that 33 culture the causative agent of swine erysipelas (94,3 %) with 35 investigated, was characterized by coagulase activity. The research results indicate the absence of correlation between coagulase activity, serotype affiliation and degree of virulence of isolates selected from different regions of Ukraine, and strains of microorganisms that were obtained from the National center for strains of microorganisms of the State scientific control Institute of biotechnology and strains of microorganisms.

Keywords: the causative agent of swine erysipelas, Erysipelothrix rhusiopathiae, coagulase activity, isolates, blood plasma, strains.

Рецензент: д.вет.н., професор Кассич В. Ю.

Дата надходження до редакції: 02.12.2015 р.

УДК 636.09:579.84:303.64

**ВИПРОБУВАННЯ СПЕЦИФІЧНОСТІ ПЛР ТЕСТ-СИСТЕМИ “САМПУЛОВАКТЕР SPP.-ПЛР-ТЕСТ”
ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ДНК БАКТЕРІЙ РОДУ САМПУЛОВАКТЕР**

О. М. Дерябін, завідувач відділу молекулярної біології та імунохімії

Н. А. Пустовіт, аспірант, мол. науковий співробітник

Н. Г. Пінчук, к.вет.н., завідувач відділу біотехнології та контролю якості бактеріальних препаратів
Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

Удосконалення методів аналізу харчових продуктів на наявність в них збудників гострих кишкових інфекцій (ГКІ), в тому числі бактерій роду *Campylobacter* spp. – одна з найбільш актуальних задач гігієни харчування. Ця задача диктується необхідністю включення мікробіологічних досліджень в систему профілактики ГКІ, а також проведення моніторингу патогенних мікроорганізмів у харчових продуктах. Проведення дослідження матеріалів на наявність кампілобактерій мікробіологічним методом потребує значних затрат часу, ресурсів, обладнання та наявності певних навиків робочого персоналу. Ефективним сучасним методом швидкої діагностики кампілобактеріозу є полімеразна ланцюгова реакція. За допомогою цього методу можливо не тільки здійснювати швид-