

УДК 619.5:6616-085.636

Касяненко О. І., д.вет.н., доцент ©

E-mail: kas-oxana@mail.ru

Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна

УДОСКОНАЛЕННЯ ТА РОЗРОБКА ЗАСОБІВ ДІАГНОСТИКИ КАМПІЛОБАКТЕРІОЗУ ПТИЦІ

У статті наведено теоретичне узагальнення й експериментальне розв'язання наукової проблеми системи контролю кампілобактеріозу птиці на основі розробки діагностичних засобів, що регламентують комплекс контролюючих заходів на етапах виховання, забою і переробки птиці. Визначено доцільність застосування методів виділення та визначення рівня контамінації м'яса бактеріями роду *Campylobacter* згідно з міжнародними стандартами. Розроблено поживне щільне середовище для культивування кампілобактерій, що дозволяє забезпечити ріст *Campylobacter* spp. у посівних концентраціях $10-10^9$ КУО/мл, а перші ознаки росту виявити через 16 год за мікроаерофільних умов культивування. Запропонована селективна добавка забезпечує селективну ізоляцію мікроорганізмів роду *Campylobacter*, пригнічуючи ріст супутньої мікрофлори (*E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocitogenes*, *P. multocidae*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*). Модифікований метод виділення *Campylobacter* spp. на основі застосування тіогіркового середовища з селективною добавкою. Застосування розробленої технології отримання діагностичної кампілобактеріозної аглютинуючої сироватки забезпечує одержання високих титрів специфічних антитіл. Удосконалені і розроблені методи і засоби діагностики відповідають вимогам міжнародної нормативної бази проведення аналітичних досліджень. Результати експериментальних досліджень використано при складанні нормативних документів.

Ключові слова: діагностика, поживне середовище, селективна добавка, мікроорганізми, кампілобактерії, діагностична сироватка, контамінація.

УДК 619.5:6616-085.636

Касяненко О. І., д.вет.н., доцент

Сумський національний аграрний університет, г. Суми, Україна

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗУ ПТИЦЫ

В статье приведено теоретическое обобщение и экспериментальное решение научной проблемы системы контроля кампилобактериоза птицы на основе разработки диагностических средств, которые регламентируют комплекс контролируемых мероприятий на этапах выращивания, забоя и

переработки птицы. Определенно целесообразность применения методов выделения и определения уровня контаминации мяса бактериями рода *Campylobacter* согласно международных стандартов. Разработана питательная плотная среда для культивирования кампилобактерий, что позволяет обеспечить рост *Campylobacter* spp. в посевных концентрациях $10-10^9$ КУО/мл, а первые признаки роста обнаружить через 16 год при микроаэрофильных условиях культивирования. Предложенная селективная добавка обеспечивает селективную изоляцию микроорганизмов рода *Campylobacter*, подавляя рост сопутствующей микрофлоры (*E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocitogenes*, *P. multocidae*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *P aeruginosa*). Модифицированный метод выделения *Campylobacter* spp. на основе применения тиогликолевой среды с селективной добавкой. Применение разработанной технологии получения диагностической кампилобактериозной агглютинирующей сыворотки обеспечивает получение высоких титров специфических антител. Усовершенствованные и разработанные методы и средства диагностики отвечают требованиям международной нормативной базы проведения аналитических исследований. Результаты экспериментальных исследований использованы при составлении нормативных документов.

Ключевые слова: диагностика, питательная среда, селективная добавка, микроорганизмы, кампилобактерии, диагностическая сыворотка, контаминация.

UDC 619.5:6616-085.636

Kasjanenko O. I., doctor of veterinary Sciences, assistant professor
Sumy national agrarian university, Sumy, Ukraine

THE IMPROVEMENT AND DEVELOPMENT OF FACILITIES OF DIAGNOSTIC OF CAMPYLOBACTERIOSIS OF POULTRY

*In the article theoretical generalization and experimental decision of scientific problem of the checking of kampilobakteriosis poultry system is resulted on the basis of development of diagnostic facilities which regulate the complex of supervisory measures on the stages of growing, to the backwall and processing of poultry. Certainly expedience of application of methods of selection and determination of level of kontamination of meats by the bacteria of sort of Campylobacter in obedience to international standards. A nourishing dense environment is developed for cultivation of kampylobakters, that allows to provide growth of Campylobacter of spp. in sowing concentrations $10-10^9$ KUO/ml, and to find out the first signs of growth through 16 hours at the mikroaerofil terms of cultivation. Offered selective addition provides the selective isolation of microorganisms of sort of Campylobacter, repressing growth of concomitant microorganisms (*E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocitogenes*, *P. multocidae*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *P aeruginosa*). Modified method of selection of Campylobacter of spp. on the basis of application of tiogikolevogo environment with selective addition. Application of the developed*

technology of receipt of diagnostic *Campylobacter* serum is provided by the receipt of high titles of specific antibodies. The improved and developed methods and facilities of diagnostics answer the requirements of international normative base of leadthrough of analytical researches. Drawn on the results of experimental researches at drafting of normative documents.

Key words: diagnostics, nourishing environment, selective addition, microorganisms, *Campylobacter*, diagnostic serum, contamination.

Вступ. Загальносвітова тенденція посилення контролю за збудниками зоонозів пов'язана з щорічним збільшенням кількості харчових токсикоінфекцій серед населення в країнах Європи та світу. Впродовж останніх років в Європейському Союзі різко посилюється увага до проблем мікробіологічної безпечності продуктів харчування в тому числі і до продукції птахівництва. Особливий контроль здійснюється за сальмонелами, кампілобактеріями і лістеріями. Ефективність контролюючих заходів насамперед залежить від своєчасної діагностики даних інфекцій.

Матеріал і методи. Робота виконувалася протягом 2006–2013 років на базі кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогієни та безпеки і якості продуктів тваринництва Сумського національного аграрного університету, окремі фрагменти – у Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ), Науково-контрольній лабораторії ТЗОВ НВФ «Бровафарма». Для проведення досліджень застосовували прилади і діагностичні засоби (тест-системи, реактиви), поживні середовища згідно з ДСТУ ISO/TS 11133-1:2005, лабораторний посуд і лабораторне обладнання згідно з ДСТУ ISO 1042:2005. Готували реактиви та розчини згідно з ДСТУ ГОСТ 4919:2008. Ізоляцію та ідентифікацію кампілобактерій із харчових продуктів здійснювали відповідно до міжнародного стандарту (ДСТУ ISO 10272-1:2007 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підрахунку кампілобактерій. Ч. 1. Метод виявлення (ISO 10272-1:2006, DT) [1–4].

Результати дослідження. Основними науковими результатами дослідження є розробка контролюючих заходів щодо здійснення моніторингу *Campylobacter spp.* В умовах забійних цехів Північно-східного регіону України ізолювано *C. jejuni*, *C. coli*, та *C. lari* із тушок та продуктів забою птиці на різних технологічних етапах переробки здорової й хворої птиці. Патогени ізолювали з поверхонь тушок та вмісту сліпих Ізоляти *Campylobacter spp.* були представлені *C. jejuni* – 76,36 %, *C. coli* – 20,93 % та *C. lari* – 2,70 %. Виділені штами кампілобактерій мали вигляд грамнегативних поліморфних, злегка зігнутих тонких, рухливих паличок. За культивування в рідких поживних середовищах культури *Campylobacter spp.* у мікроаерофільних умовах за температури 37–42° С через 24–48 год утворюють незначне помутніння з пухким осадом на дні пробірки; на щільних – через 48–96 год культивування формують дрібні вологі, блискучі, прозорі колонії матового кольору; в напіврідких – через 24–48 год колонії мали вигляд ніжних сіруватих дисків під

поверхнею середовища. Виконано депонування штаму *Campylobacter jejuni* в Депозитарії Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. Це дозволило одержати штаму *Campylobacter jejuni subspecies jejuni* C.2008 для виготовлення імунобіологічних препаратів.

Здійснено порівняльну оцінку ефективності методик виділення кампілобактерій з продукції птахівництва за чинними міжнародними стандартами: згідно зі стандартом ДСТУ ISO 10272-1:2007 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підрахунку кампілобактерій (*Campylobacter spp.*). Ч. 1. Метод виявлення (ISO 10272-1:2006, DT) та методом FDA «Выделение бактерий рода *Campylobacter* из продовольствия и воды» [Food & Drug Administration, 2001].

Експериментальними дослідженнями встановлено, що за методом FDA ріст колоній тест-штамів був значно швидшим, ніж на селективних середовищах за методом ISO навіть при низьких дозах контамінації м'ясного фаршу. Це дозволило одержувати результати в коротші терміни.

Нами удосконалено метод FDA на основі застосування тіогліколевого середовища з селективною добавкою (гентаміцин сульфат – 2 мг; цефалексин – 156 мг; рифампіцин – 150 мг із розрахунку на 1 літр поживного середовища) як середовища збагачення. Модифікований метод забезпечував виявлення кампілобактерій у досліджуваних зразках на рівні 1 КУО/г (для *C. jejuni*) – відсутність збудника в 25 г продукту, а також збереження стабільності біологічних властивостей бактерій *Campylobacter spp.* Напіврідка консистенція тіогліколевого середовища створювала додаткові мікроаерофільні умови для росту цих мікроорганізмів, що сприяло інтенсивнішому росту колоній кампілобактерій і виявленню перших ознак їх росту порівняно з висівом проб харчових продуктів у рідкі поживні середовища. Отримані результати свідчать про збереження стабільності властивостей бактерій роду *Campylobacter*, ріст їх культур мав характерні ознаки. Це дало змогу ідентифікувати ці мікроорганізми за характерними морфологічними ознаками колоній у коротші строки (через 16–18 год культивування) та сприяти підвищенню ефективності досліджень.

Крім того проведено дослідження в порівняльному аспекті ефективності методів кількісного аналізу на предмет контамінації *Campylobacter spp.* продукції птахівництва за міжнародними стандартами. Встановлено, що метод виділення бактерій роду *Campylobacter* за міжнародним стандартом FDA, 2001 має переваги над відповідним методом досліджень за ДСТУ ISO 10272-1:2007 у швидкості росту колоній за найменших доз контамінації (10 КУО) і дає змогу одержувати результати за коротші терміни (через 24 год).

Модифікований нами метод виділення *Campylobacter spp.* із продовольства FDA, 2001 на основі застосування тіогліколевого середовища з селективною домішкою (гентаміцин сульфат – 2,0 мг; цефалексин – 156 мг; рифампіцин – 150 мг) на етапі збагачення контамінованих проб забезпечив отримання чистої культури *Campylobacter spp.*, високий рівень чутливості при дослідженні проб із рівнем контамінації 1 КУО/г. Запропонований спосіб

виділення мікроорганізмів роду *Campylobacter* із харчових продуктів затверджений в установленому порядку (Патент України 50353).

Ефективність мікробіологічних досліджень залежить від методів бактеріологічних досліджень та якості поживних середовищ. Підбір та оптимізацію складових компонентів середовища поживного щільного для культивування *Campylobacter spp.* проводили за критеріями забезпечення прискореного росту кампілобактерій, збереження біологічних властивостей ізолятів при культивуванні, а також накопичення виходу бактеріальної маси.

До основного складу дослідної композиції включали: протеозопептон, печінковий та дріжджовий екстракти – як білкову основу, натрій бурштиновокислий (натрію сукцинат) – стимулятор росту культур *Campylobacter spp.*, натрію хлорид – для регулювання осмотичного тиску та агар-агар. Оптимальний склад інгредієнтів поживного щільного середовища для культивування кампілобактерій забезпечує ріст *Campylobacter spp.* у посівних концентраціях $10\text{--}10^9$ КУО / мл, а перші ознаки росту виявити через 17–24 год за мікроаерофільних умов культивування. Поживне середовище сприяє росту всіх тест-штамів кампілобактерій у дозах $10\text{--}10^9$. Зареєстровано ріст *C. jejuni* 70.2Т у чашках Петрі з посівами $10\text{--}10^9$ КУО/см³, *C. coli* та 43477 *C. lari* в концентраціях $10^5\text{--}10^9$ КУО/см³, *C. fetus* 5396 в концентраціях $10^7\text{--}10^9$ КУО/см³ та *C. bubulus* 53103 – у чашках Петрі з посівною дозою $10^6\text{--}10^9$ КУО/см³. Запропоноване поживне середовище відповідає вимогам Європейської фармакопеї щодо бактеріологічного контролю ростових властивостей поживних середовищ, забезпечує інтенсивний ріст *Campylobacter spp.*, збереження біологічних властивостей ізолятів за культивування, а також активне накопичення значної кількості живих бактеріальних клітин *Campylobacter spp.* $8,93\pm 0,21\times 10^6$ КУО/см³, що в 1,3 раза перевищує аналогічний показник у контролі. На розроблений продукт оформлена і зареєстрована нормативна документація (ТУ У 24.4-14332579-056:2010) та отримано патент на корисну модель України № 36641 «Поживне середовище для кампілобактерій» (від 10.11.2008 р.).

Складність ізоляції мікроорганізмів роду *Campylobacter* із патологічного матеріалу, об'єктів зовнішнього середовища та харчових продуктів зумовлюється випереджальним ростом на поживних середовищах супутньої мікрофлори. Селективна ізоляція кампілобактерій передбачає обов'язкове внесення до складу поживних середовищ суміші селективних компонентів – хіміотерапевтичних засобів як окремо, так і в різних поєднаннях, які пригнічують ріст супутньої мікрофлори. На підставі результатів проведених досліджень встановлено, що до поживних середовищ для селективної ізоляції *Campylobacter spp.* доцільно додавати антибіотики у таких кількостях на 1 л: гентаміцину 2 мг; цефалексину 156 мг; рифампіцину 150 мг виробництва ЗАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» (м. Київ). На розроблений продукт оформлена і зареєстрована нормативна документація (ТУ У 24.4-14332579-066:2012) «Селективна домішка до поживних середовищ для ізоляції *Campylobacter spp.*».

Отримано патент на корисну модель України 65594 «Спосіб селективної ізоляції мікроорганізмів роду *Campylobacter* із харчових продуктів».

Також нами розроблено технологію отримання діагностичних кампілобактеріозних аглютинуючих сироваток. Застосування розробленої технології отримання діагностичної кампілобактеріозної аглютинуючої сироватки, що включає п'ятикратну, з інтервалом 7 діб, імунізацію тварин-продуцентів антигенним штамом *C. jejuni spp. jejuni C.2008* у поєднанні з імуностимулятором «Тимогеном» у дозі 10 мкг/кг (одночасно з ін'єкцією антигена), препаратом «Тривітамін» у дозі 1 см³/гол. одноразово в третій ін'єкції, забезпечує одержання високих титрів специфічних антитіл – 3886±1437. Отримані результати свідчать, що запропонована нами схема імунізації тварин-донорів кампілобактеріозних сироваток виявилася ефективною – сироватки характеризувалися високим рівнем вмісту аглютининів. Оптимальна концентрація мікробних клітин у зависі, що використовується як антиген в РА з кампілобактеріозними діагностичними сироватками, становить 3×10⁹ м.к/см³. Специфічність отриманих сироваток вивчали в РА із антигенами споріднених мікроорганізмів: *S. typhimurium*; *E. coli*; *P. vulgaris*; *E. aerogenes*. При цьому встановлено, що отримані нами сироватки не давали перехресних реакцій із антигенами гетерологічних видів мікроорганізмів – РА із мікробними зависями цих видів мікробів була негативною у вихідному розведенні сироваток (1:25). Це свідчить про високу специфічність аглютинуючих кампілобактеріозних сироваток. Отже, поєднання дії імуностимулятора та вітамінного препарату є ефективною комбінацією препаратів різних груп і термінів їх застосування для активації механізмів імунітету. Отримана діагностична кампілобактеріозна аглютинуюча сироватка використовувалася нами в роботі для серологічної типізації ізолятів *Campylobacter spp.* На підставі проведеної роботи і отриманих результатів нами одержано патент України на корисну модель 61997 «Спосіб одержання діагностичної сироватки кампілобактеріозної аглютинуючої».

Отже, за результатами проведених експериментальних досліджень нами науково обґрунтовано і розроблено засоби діагностики: поживне середовище та селективна добавка для ізоляції кампілобактерій, технологія отримання діагностичної кампілобактеріозної аглютинуючої сироватки. Гармонізовано методи якісного та кількісного аналізу контамінованої *Campylobacter spp.* продукції птахівництва за міжнародними стандартами, розроблено нормативні документи відповідно до законодавства ЄС, що забезпечує ефективність роботи та належну якість діагностичних досліджень.

Одержані результати отримали практичне значення. На підставі одержаних результатів експериментальних досліджень розроблено систему заходів контролю щодо кампілобактеріозу на етапах вирощування, забою і переробки курей. Результати експериментальних досліджень використано при складанні таких нормативних документів: Інструкції з профілактики та ліквідації кампілобактеріозу птиці, затвердженої наказом Міністерства аграрної політики та продовольства України 28.09.2011 № 502 та зареєстрована в

Міністерстві юстиції України 14.10.2011 р. за № 1192/19930; Науково-методичних рекомендаціях «Виділення мікроорганізмів роду *Campylobacter* із продукції птахівництва та порядку її ветеринарно-санітарної експертизи», затверджених на засіданні Науково-методичної ради Державного комітету ветеринарної медицини України (протокол № 1 від 23.12.2010 р.); Науково-методичних рекомендаціях «Ветеринарно-санітарного контролю м'яса птиці та яйцепродуктів на наявність збудників зоонозів (*Campylobacter*, *E.coli* O157, *Enterobacteriaceae*, *Listeria*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Yersinia*). Відбір проб.», затверджених Науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України (протокол № 4 від 21.12.2011 р.); «Мікробіологічні критерії для боєнь (відповідно до законодавства ЄС)».

За результатами досліджень вперше теоретично й експериментально обґрунтовано систему контролю кампілобактеріозу курей на основі розробки засобів та методів його діагностики.

Висновки.

1. Показано, що метод виділення бактерій роду *Campylobacter* із харчових продуктів за міжнародним стандартом FDA, 2001 має переваги над відповідним методом досліджень за ДСТУ ISO 10272-1:2007 у швидкості росту колоній при найменших дозах контамінації (10 КУО) й дає змогу одержувати результати за коротші терміни (через 24 год). Метод визначення рівня контамінації м'яса птиці кампілобактеріями за міжнародним стандартом ДСТУ ISO 7218:1996 кращий відповідного методу досліджень, регламентованого ДСТУ ISO 10272-1:2007, за рівнем (вищий на 4,0–5,1 %), терміном інкубації (менший на 1 добу) та за трудомісткістю дослідження.

2. Розроблене поживне щільне середовище для культивування кампілобактерій, що включає: протеозопептон 15,0 г; печінковий екстракт 5,0 г; дріжджовий екстракт 5,0 г; натрій бурштиновокислий 2,0 г; натрію хлорид 3,0 г; агар-агар 8,0 г та воду дистильовану до 1 л, дозволяє забезпечити ріст *Campylobacter spp.* у посівних концентраціях $10\text{--}10^9$ КУО/мл, а перші ознаки росту виявити через 16 год за мікроаерофільних умов культивування.

3. Запропонована селективна добавка з антибактеріальних препаратів, до складу якої входять; мг: гентаміцин сульфат 2,0; цефалексин 156; рифампіцин 150 на 1 л поживного середовища, забезпечує селективну ізоляцію мікроорганізмів роду *Campylobacter*, пригнічуючи ріст супутньої мікрофлори (*E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocitogenes*, *P. multocidae*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*). Модифікований метод виділення *Campylobacter spp.* на основі застосування тіогіколевого середовища з селективною добавкою (гентаміцин сульфат – 2,0 мг; цефалексин – 156 мг; рифампіцин – 150 мг) на етапі збагачення контамінованих проб забезпечив отримання чистої культури *Campylobacter spp.*, високий рівень чутливості у процесі дослідження проб із рівнем контамінації 1 КУО/г.

4. Застосування розробленої технології отримання діагностичної кампілобактеріозної аглютинуючої сироватки, що включає п'ятикратну, з інтервалом 7 діб, імунізацію тварин-продуцентів антигенним штамом

C. jejuni spp. *jejuni* C.2008 у поєднанні з імуностимулятором «Тимогеном» у дозі 10 мкг/кг (одночасно з ін'єкцією антигена), препаратом «Тривітамін» у дозі 1 см³/гол. одноразово в третій ін'єкції, забезпечує одержання високих титрів специфічних антитіл – 3886±1437.

Перспективи подальших досліджень. Будуть розроблені методи експрес-діагностики збудників токсикоінфекцій та токсикозів на виявленні їх на всіх етапах харчового ланцюга.

Література

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. – 28 с. – (Національний стандарт України).

2. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови мікробіологічних досліджень (ISO 7218:1996, IDT) : ДСТУ ISO 7218:2008. – [Чинний від 2011-01-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2008. – 11 с. – (Національний стандарт України).

3. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Настанови щодо готування та виробництва поживних середовищ. Частина 1. Загальні настанови щодо виготовлення поживних середовищ гарантованої якості в лабораторії (ISO/TS 11133-1:2000, IDT) : ДСТУ ISO/TS 11133-1:2005. – [Чинний від 2008.03.01]. – К. : Держспоживстандарт України 2008. – 23 с. (Національний стандарт України).

4. Посуд лабораторний скляний. Колби мірні з однією позначкою : (ISO 1042:1998, IDT) : ДСТУ ISO 1042:2005. – [Чинний від 2008-01-01]. – К. : Держспоживстандарт України, 2008. – 24 с. – (Національний стандарт України).

Рецензент – д.вет.н., професор Слівінська Л.Г.