

УДК 619:579.62:602.3

**ЯКУБЧАК О.М.**, д-р вет. наук, професор, e-mail olga.yakubchak@gmail.com,**ЛАПА О.Ю.\***, e-mail llu706@mail.ru

Національний університет біоресурсів і природокористування України

**БОЙКО П.К.**, д-р вет. наук, ст. наук. сп., e-mail pkboyko@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

## ВИВЧЕННЯ МОРФОЛОГІЧНИХ ОЗНАК І ВЛАСТИВОСТЕЙ ВИДІЛЕНИХ КУЛЬТУР *CAMPYLOBACTER SPP.* ТА ЕТАЛОННОГО ШТАМУ

У статті наведені результати досліджень морфологічних ознак, тинкторіальних, культуральних і біохімічних властивостей виділених мікроорганізмів від свиней та великої рогатої худоби в порівнянні з еталонним штамом *Campylobacter jejuni*.

За біохімічними показниками встановлено, що виділені збудники від великої рогатої худоби відносились до *Campylobacter jejuni*, а від свиней – *Campylobacter coli*. Не виявлено суттєвих відмінностей культуральних і біохімічних властивостей у досліджуваних культурах та еталонного штаму *Campylobacter*.

**Ключові слова:** *Campylobacter*, морфологічні ознаки, тинкторіальні, культуральні, біохімічні властивості.

**Вступ.** В останні роки в Україні, як і в країнах Європи, харчовий фактор серед спалахів захворюваності гострими кишковими інфекціями стабільно зростає. Його частка становить 40–50% від усіх хворих. Економічні втрати від цих захворювань перевищують мільйон доларів США [1, 2]. Це обумовлено глибокими змінами основних рушійних сил епідемічного процесу харчових токсикоінфекцій, які пов'язані з неконтрольованим застосуванням антибіотиків у гуманній та ветеринарній медицині. Новітні технології тривалого зберігання продовольчої сировини і продуктів харчування створили сприятливі умови для накопичення в продуктах маловивчених мікроорганізмів. З'явилися їхні нові форми, що супроводжуються транслокацією збудників із кишечника в кров та внутрішні органи тварин і людей. За рахунок мікроорганізмів значно зросли ризики виникнення захворювань. До числа емерджентних патогенів відноситься і *Campylobacter spp.*, який викликає особливу занепокоєність у фахівців, оскільки цей агент відноситься до числа представників нормальної мікрофлори травного каналу тварин та птиці [3–5].

Аналіз наукової літератури свідчить, що бактерії роду *Campylobacter* є однією з основних причин гострих кишкових інфекцій бактеріального походження в мешканців розвинених країн, перевищуючи в деяких регіонах частоту реєстрації сальмонельозів та ешеріхіозів [6–8].

Саме тому необхідно всебічно вивчити морфологічні та фізіологічні особливості мікроорганізмів роду *Campylobacter* з метою вдосконалення

\* Аспірант, науковий керівник – д-р вет. наук **О.М. Якубчак**

методів індикації й ідентифікації цих збудників серед інших патогенів харчових токсикоінфекцій.

**Мета роботи:** вивчити морфологічні ознаки, культуральні, тинкторіальні та біохімічні властивості, чутливість до антимікробних речовин виділених від свиней та великої рогатої худоби мікроорганізмів у порівнянні з еталонним штамом *Campylobacter jejuni*, за цими показниками встановити вид збудників.

**Матеріали і методи досліджень.** Виділення ізолятів *Campylobacter spp.* проводили згідно чинного ДСТУ ISO 10272-1:2007 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підрахунку кампілобактерій (*Campylobacter spp.*) Частина 1. Метод виявлення (ISO 10272-1:2006, IDT) [9].

Матеріалом для ізоляції кампілобактерій слугував: вміст сліпих кишок великої рогатої худоби і свиней, що відбиралися на бойні.

Для виділення кампілобактерій використовували бульйон Болтона, *Campylobacter*-агар М 994, деревно-вугільний дезоксихолатний агар із цефоперазоном (mCCD-агар) виробництва *Himedia Laboratories* (Індія).

Усі культури інкубували за температури  $41,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  в ексікаторі у мікроаеробних умовах, яких досягали за допомогою методу «палаючої свічки».

Морфологію виділених мікроорганізмів вивчали за допомогою світлової (фарбування за Грамом) і фазово-контрастної мікроскопії (препарат «роздушена крапля»). Культуральні, біохімічні властивості та антибіотикорезистентність кампілобактерій досліджували згідно загальноприйнятих методик. Диференціальну діагностику проводили за визначником Берджі [10].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Відібрані нами проби вмісту сліпих кишок від свиней та великої рогатої худоби спочатку вносили у середовище накопичення (бульйон Болтона) і ставили в термостат на 2 доби за температури  $41,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Виявляли характерне для кампілобактерій однорідне помутніння та осад у пробірках. Після пересіву культур з рідкого середовища на 2 твердих, які кардинально відрізнялися за своїм складом (М 994 і МССD-агари), через 48 год інкубування спостерігали наступні зміни: культури мікроорганізмів утворювали ніжні дрібноросинчасті сіро-білі чи сіро-блакитні дрібні блискучі випуклі колонії, що нагадували краплі конденсату, характерні для кампілобактерій (рис. 1, 2).

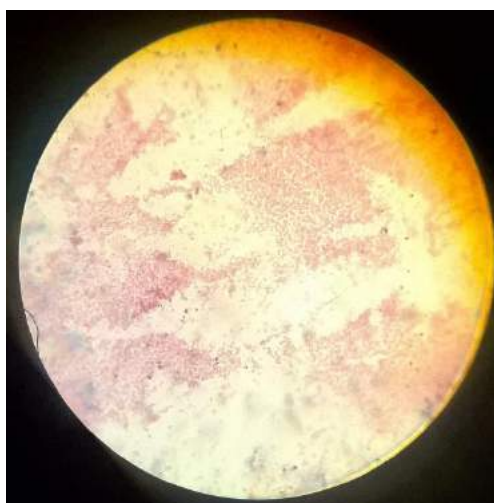


**Рис. 1. Ріст кампілобактерій на середовищі МССD.**



**Рис. 2. Ріст кампілобактерій на середовищі М 994.**

У препаратах, зафарбованих за Грамом, виявляли грамнегативні палички, що мали вигляд тонких спірально вигнутих навколо осі мікроорганізмів; деякі з них мали вигляд коми, чайки у польоті чи латинської букви V; спор та капсул не утворювали (рис. 3).



**Рис. 3. Кампілобактерії в полі зору світлового мікроскопу (збільшення 90×10).**

Інкубування виділених культур упродовж 72 год і довше призводило до поліморфізму – типові звивисті форми бактерій перетворювалися на кокові та паличкоподібні форми різної величини.

Фазово-контрастною мікроскопією в препаратах «роздушена крапля» виявляли тонкі поліморфні рухливі палички, які мали гвинтоподібний рух.

Результати вивчення культуральних і біохімічних властивостей та чутливості кампілобактерій до окремих антибактеріальних речовин вказували, що всі культури мікроорганізмів утворювали каталазу (швидка поява бульбашок під час реакції у виділених культурах від великої рогатої худоби, трохи повільніша – у виділених культурах від свиней) та оксидазу (утворення

насиченого фіолетового забарвлення під час реакції у культурах від великої рогатої худоби, бузкового – у культурах від свиней; табл. 1).

Таблиця 1

**Культурально-біохімічні властивості та чутливість до окремих антибактеріальних речовин польових ізолятів і еталонного штаму кампілобактерій**

Показники	Результати досліджень польових ізолятів та еталонного штаму <i>Campylobacter</i>		
	Мікроорганізм і виділені від великої рогатої худоби	Мікроорганізми виділені від свиней	<i>Campylobacter jejuni</i>
Ріст за 25°C	–	–	–
Ріст за 37°C	+	±	+
Ріст за 41°C	+	+	+
Ріст на середовищі з 1% гліцерином	+	+	+
Ріст на середовищі з 1% бичачої жовчі	+	+	+
Ріст на середовищі з 1,5% NaCl	–	–	–
Гемоліз на КГМПА	–	–	–
Утворення H <sub>2</sub> S на трицукровому агарі	–	–	–
Продуктування оксидази	+	±	+
Продуктування каталази	+	±	+
Продуктування індолу	–	–	–
Гідроліз натрію гіпурату	+	–	+
Перетворення нітратів до нітритів	–	–	–
Чутливість до налідиксової кислоти	чутливі	чутливі	чутливі
Чутливість до цефалотину	резистентні	резистентні	резистентні

За результатами температурного тесту не виявлено ростових властивостей виділених культур при 25°C; при 37°C відзначався дещо сповільнений ріст, особливо у виділених культурах від свиней, а оптимальною для росту всіх досліджених мікроорганізмів була температура 41±0,5°C.

Згідно результатів даних досліджень, можна стверджувати, що виділені нами культури відносилися до роду *Campylobacter*.

Культури *Campylobacter* не продукували індол, не відновлювали нітратів до нітритів, не утворювали сірководень під час культивування на трицукровому агарі. Ці біохімічні властивості проявляли всі три види досліджуваних культур – виділенні мікроорганізми від великої рогатої худоби та свиней і еталон *Campylobacter jejuni*.

Із культуральних властивостей слід відзначити, що виділені мікроорганізми *Campylobacter* росли на середовищах з 1,5% NaCl, 1% гліцином

та 1% бичачої жовчі, не проявляли гемолітичних властивостей; були чутливими до налідиксової кислоти та резистентні до цефалотину.

Еталонний штам *Campylobacter jejuni* та виділені мікроорганізми від великої рогатої худоби розкладали натрію гіпурат з утворенням натрію бензоату та натрію гліцинату (який давав кольорову реакцію з нінгідрином – під час реакції протягом 1–2 хв колір розчину змінювався на фіолетовий).

За результатом біохімічних досліджень можемо стверджувати, що виділені культури від великої рогатої худоби належали до виду *Campylobacter jejuni*, як і еталонний штам, тоді як виділені культури від свиней – до *Campylobacter coli*.

#### **Висновки та перспективи подальших досліджень:**

1. За тинкторіальними, культуральними властивостями та морфологічними ознаками встановлено, що виділені мікроорганізми належать до роду *Campylobacter* – грамнегативні рухливі палички, які мали вигляд тонких, спірально вигнутих навколо осі мікроорганізмів, спор та капсул не утворювали. На рідких живильних середовищах створювали помутніння та осад, на щільних – сіро-білі чи сіро-блакитні колонії, що нагадували краплі конденсату.

2. В реакції з натрієм гіпуратом встановлено, що виділені культури зі сліпих кишок великої рогатої худоби так само, як і еталонний штам, належали до виду *Campylobacter jejuni*, а виділені культури зі сліпих кишок свиней – до *Campylobacter coli*.

3. Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення вірулентності, антигенності та імуногенності ізолятів, отримання специфічних анти-*Campylobacter* сироваток з метою виготовлення діагностикумів для виявлення й ідентифікації кампілобактерій.

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Кампілобактеріоз птиці : [монографія] / Т.І. Фотіна, А.В. Березовський, О.І. Касяненко, Ю.Є. Дворська. – Сумський національний аграрний університет, 2010. – 140 с.
2. Куликовский А.В. Эмерджентные пищевые зоонозы / А.В. Куликовский. – М.: Крафт Плюс, 2004. – 176 с.
3. Голиков А.В. Вибриоз домашних животных и птицы / А.В. Голиков – М.: Россельхозиздат, 1978. – 112 с.
4. Скородумов Д.И., Субботин В.И., Сидоров М.А., Костенко Т.С. – Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных: М.: Изограф, 2005. – 656 с.
5. Identification of *Campylobacter* species. UK Standards for Microbiology Investigations [Електронний ресурс] // Public Health England. – 2015. – Режим доступу до ресурсу: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/436968/ID\\_23i3.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/436968/ID_23i3.pdf).
6. Литусов Н.В. Кампилобактерии. Иллюстрированное учебное пособие / Н.В. Литусов. – Екатеринбург: Изд-во ГБОУ ВПО УГМА, 2012. – 18 с.
7. Пиляй С.В. Кампілобактеріоз птиці та його діагностика / С.В. Пиляй // Ветеринарна біотехнологія. – 2013. – № 22. – С. 168–174.
8. Фотіна Т.І. Диференціально-діагностичні ознаки кампілобактерій / Т.І. Фотіна, О.І. Касяненко, Т.В. Вершняк / Вісник СНАУ (Наук. метод. журнал). Серія «Ветеринарна медицина». – Суми, 2009. – Вип. 3 (24). – С. 135–138.
9. 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 2008-03-01]. – К. Держспоживстандарт України 2008. – 23 с. (Національний стандарт України).

10. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Пер. с англ./ Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига и др. – М.: Мир, 1997. – Т. 1. – С. 61–64.

**ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ И СВОЙСТВ ИЗОЛЯТОВ САМПЫЛОБАКТЕР SPP. И ЭТАЛОННОГО ШТАММА / Якубчак О.Н., Лапа Е.Ю., Бойко П.К.**

*В статье приведены результаты исследований морфологических признаков, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств выделенных микроорганизмов от свиней и крупного рогатого скота в сравнении с эталонным штаммом Campylobacter jejuni.*

*По биохимическим показателям установлено, что выделенные возбудители от крупного рогатого скота относились к Campylobacter jejuni, а от свиней – к Campylobacter coli. Не выявлено существенных различий культуральных и биохимических свойств у исследуемых культур и эталонного штамма Campylobacter.*

**Ключевые слова:** Campylobacter, морфологические признаки, тинкториальные, культуральные, биохимические свойства.

**STUDY OF MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND PROPERTIES OF ISOLATES OF CAMPYLOBACTER SPP. AND REFERENCE STRAIN / Yakubchak O., Lapa O., Boyko P.**

**Introduction.** *The analysis of the scientific literature showed that Campylobacter pathogen in major cases causes acute intestinal infections of bacterial origin spread in developed countries, in some areas even exceeding cases of Salmonellosis and Escherichiosis incidence. Therefore, it is necessary to examine general characterization of Campylobacter genus microorganisms and their properties to improve the diagnostics and identification of these pathogens from other food-borne agents.*

**The goal of the work:** *research the morphological characteristics, cultural, tinctorial, biochemical properties and sensitivity to antimicrobial substances of two isolates of Campylobacter and the reference strain Campylobacter jejuni, identify their genus.*

**Materials and methods.** *Isolation of strains was performed according to the current DSTU ISO 10272-1: 2007. The differential diagnosis was performed by Bergey's manual of determinative bacteriology. The material for the isolation of Campylobacter was: contents of the blind gut of cattle and pigs.*

**Results of research and discussion.** *We studied strains and identified the types of Campylobacter isolates according to the abovementioned methods.*

**Conclusions and prospects for further research.** *1. Tinctorial, cultural properties and morphological characteristics revealed that the studied isolates belonged to the genus Campylobacter – were gram-negative rods moving, looked like a thin, spirally curved around the axis of microorganisms, capsules and spores do not form. During cultivation in liquid nutrient media noted the typical uniform turbidity and sediment in vitro, in dense environments was significantly grayish-white or gray-bluish colonies, resembling drops of condensation.*

*2. As a result of biochemical research, namely the reaction of sodium hipurat, we can say that 1-st isolate, as well as the reference strain was the Campylobacter jejuni species (formation a violet color), and 2-nd isolate – was Campylobacter coli.*

*Further researches will be focused on study of the isolates pathogenicity and serological properties for Campylobacter diagnostics.*

**Keywords:** Campylobacter, morphological features tinctorial, cultural, biochemical properties.

REFERENCES

1. Fotina, T.I., Berezovskiy, A.V., Kasyanenko, O.I. & Dvorska, Yu.E. (2010). *Kampilobakterioz ptitsi [Campylobacteriosis birds]*. SNAU [in Ukrainian].
2. Kulikovskiy, A.V. (2004). *Emerdzhentnye pishchevye zoonozy [Emergent food zoonotic agents]*. M.: Kraft+ [in Russian].
3. Golikov, A.V. (1978). *Vibrioz domashnih zivotnyh i ptitsy [Vibriosis livestock and poultry]*. M.: Rosselhozizdat [in Russian].
4. Skorodumov, D.I., Subbotin, V.I., Sidorov, M.A. & Kostenko, T.S. (2005). *Mikrobiologicheskaya diagnostika bakterialnyh bolezney zivotnyh [Microbiological diagnosis of bacterial diseases of animals]*. M.: Izograf [in Russian].
5. *Identification of Campylobacter species. UK Standards for Microbiology Investigations* (2015). *Public Health England*, 23, 24.
6. Litusov, N.V. (2012). *Kampilobakterii [Campylobacters]*. Ekaterinburg: Izd-vo GBOU VPO UGMA [in Russian].
7. Pilyay, S.V. (2013). Kampilobakterioz ptitsi ta yogo diagnostika [Campylobacteriosis poultry and its diagnosis]. *Veterinarna biotekhnologiya – Veterinary biotechnology*, 22, 168–174 [in Ukrainian].
8. Fotina, T.I., Kasyanenko, O.I. & Vershnyak, T.V. (2009). Diferentsialno-diagnostichni oznaki kampilobakteriy [Differential diagnostic signs of Campylobacter]. *Visnik SNAU «Veterinarna meditsina» – Official SNU Journal «Veterinary medicine»*, 3, 24, 135–138 [in Ukrainian].
9. Mikrobiologiya harchovih produktiv i kormiv dlya tvarin. Gorizontalniy metod viyavlennya i pidrahunku kampilobakteriy (Campylobacter spp.). Chastina 1. Metod viyavlennya [Microbiology of food and animal feed. Horizontal method for detecting and counting Campylobacter (Campylobacter spp.). Part 1: Detection method]. (2007). *DSTU ISO 10272-1:2007 from 03.01.2008*. K.: Derzhspozhivstandart Ukrayini [in Ukrainian].
10. Houlta, Dzh, Kriga, N. & Snita, P. (1997). *Opredelitel bakteriy Berdzhi [Bergey's manual of determinative bacteriology]*. Dzh. Houlta, N. Kriga, P. Snita, Dzh. Sieyli, S. Uillyamsa. (Ed.). (Vols. 1-2) M.: Mir [in Russian].