

УДК 619.5:6616-085.636.5

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ ТЕРМОФІЛЬНИХ КАМПІЛОБАКТЕРІЙ ІЗ ПРОДУКЦІЇ ПТАХІВНИЦТВА

Касяненко О.І., Фотіна Т.І.

Сумський національний аграрний університет, м. Суми

У більшості країн Європи та світу на підставі моніторингових досліджень щодо оцінки ризику мікробіологічної контамінації продукції птахівництва встановлено домінуючу роль термофільних кампілобактерій *Campylobacter spp.*, серед інших ізолятів. *Campylobacter spp.* оцінюють як потенційні збудники гострих кишкових інфекцій людини при споживанні продукції птахівництва забруднених даними мікроорганізмами [4, 6, 9].

На 36 сесії комісії Кодекс Аліментаріус [FAO/WHO, 2004], присвяченій розробці стратегії управління ризиком кампілобактеріозу, як харчової токсикоінфекції, підкреслювалася необхідність отримання повного збору даних про поширеність кампілобактерій в продукції птахівництва. При цьому, особливо наголошувалася важливість гармонізації стандартів безпеки цієї продукції, ключовим аспектом якої є визнання еквівалентності різних аналітичних методик дослідження торговельних партнерів [1-3, 5-10].

Метою дослідження була оцінка ефективності методів контролю контамінації м'яса птиці, що регламентовані міжнародними стандартами, на предмет якісної і кількісної оцінки реізоляції *Campylobacter spp.* як з точки зору методології, так і отриманих результатів.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проводили на базі лабораторії кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогієни, безпеки та якості продуктів тваринництва факультету ветеринарної медицини СНАУ.

Поставлену задачу вирішували шляхом випробування способів виділення мікроорганізмів роду *Campylobacter* з харчових продуктів шляхом удосконалення етапу збагачення дослідного матеріалу, забезпечення достовірності та ефективності досліджень.

У роботі використовували культури штамів *Campylobacter jejuni jejuni* № 70.2Т (Інститут Пастера, Франція), *Campylobacter coli* № 43477 (АТСС) Американської колекції штамів мікроорганізмів, *Campylobacter lari* 729 із колекції штамів ФГУ «ВГНИ», оптичний стандарт мутності ДНКІБШМ, м. Київ. Стерильний м'ясний фарш, який був виготовлений із курячих стегон, придбаних в мережі роздрібної торгівлі. Із ясного фаршу готували наважки масою 150 г. У кожному із наважок вносили суспензії кампілобактерій кожного підвиду окремо з наступними розрахунковими концентраціями: 1×10^{-1} – 1×10^3 КУО/г породукту. Ідентифікацію ізольованих культур мікроорганізмів здійснювали, використовуючи визначник Берджи (1997).

На першому етапі нами була проведена робота щодо аналізу та порівняльної оцінки ефективності схем виділення термофільних кампілобактерій із продукції птахівництва, які застосовуються в закордонній та вітчизняній лабораторній практиці, розробки доступної і ефективної для практичних досліджень методики виявлення кампілобактерій в продукції птахівництва.

У світовій практиці використовують два офіційно зареєстрованих культуральних методи ізоляції кампілобактерій із харчових продуктів: згідно міжнародних стандартів (ДСТУ ISO 10272-1:2007 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та драхунку кампілобактерій (*Campylobacter spp.*). Частина 1. Метод виявлення (ISO 10272-1:2006, DT) та FDA «Выделение бактерий рода *Campylobacter* из продовольствия и воды» [Food & Drug Administration, 2001]. Вищезазначені методи дозволяють провести лише якісний аналіз продуктів харчування на наявність мікроорганізмів роду *Campylobacter*.

Обидва методи регламентують посів дослідної проби в спеціальні рідкі середовища збагачення з метою накопичення бактеріальної маси, наступний пересів культур на поверхню щільного поживного середовища та подальшу ідентифікацію типових колоній мікроорганізмів за біохімічними тестами. Поряд з тим, дані методи мають відмінності щодо схеми виконання дослідження та набору поживних середовищ. З метою порівняльної оцінки ефективності схем виділення кампілобактерій з продукції птахівництва за міжнародними стандартами нами було проведено дослідження в трьох послідовностях, відповідно.

Дослідну порцію чи вихідну суспензію готували згідно зі спеціальним міжнародним стандартом ISO 6887 або ISO 8261. Для приготування вихідної суспензії дослідну порцію (маси чи об'єму) поміщали в середовище накопичення так, щоб одержати співвідношення дослідна порція/середовище накопичування 1:10 (маса/об'єм чи об'єм/об'єм). Приготовлену вихідну суспензію гомогенізували. У подальшому вихідну суспензію інкубували в мікроаерофільній атмосфері за температури 37 °С протягом 4-6 годин, а потім продовжували інкубацію при температурі 41,5 °С. Після 44±4 годин культивування чашки перевіряли на наявність типових колоній для кампілобактерій.

Культури, що виростили в середовищі накопичення, висівали на поверхню селективного ізоляційного середовища mCCD агар (модифікований дезоксихолатний агар із активованим вугіллям) та на дві чашки селективного середовища Preston з сумішшю антибіотиків: цефоперазон – 0,02 г; ванкоміцин – 0,02 г; триметопрім лактат – 0,02 г; амфотеріцин В – 0,01 г та 5 % до об'єму середовища лізованої крові коня. Інкубацію посівів продовжили в мікроаерофільній атмосфері за температури 41,5 °С. Для підтвердження належності культур, що виростили до видів *Campylobacter* типові колонії пересівали на поверхню чашок з колумбійським кров'яним агаром. Чисті культури ідентифікували шляхом дослідження морфології, рухливості, здатності до мікроаеробного росту за температури 25 °С, аеробного росту за температури 41,5 °С та на оксидазну активність.

Згідно схеми виконання досліджень щодо виявлення кампілобактерій згідно FDA «Выделение бактерий рода *Campylobacter* из продовольствия и воды» [Food & Drug Administration, 2001] наважку масою 25 г поміщали в стерильний пакет одноразового використання з полімерного матеріалу з 100 мл бульйону Болтона (середовище збагачення) з домішками крові, суміші антибіотиків та аеротолерантною домішкою. Вміст пакету струшували протягом 5 хвилин, отримані змиви використовували в якості вихідного матеріалу для подальших досліджень. У подальшому проводили попереднє збагачення посівів за температури 37 °С протягом 4 годин і дві години за температури 37 °С. На етапі збагачення посіви культивували в мікроаерофільних умовах при температурі 42 °С протягом 20-44 годин.

Наступним етапом досліджень був пересів дослідних проб на селективні середовища з додаванням стерильної крові коня – 7 % до об'єму середовища, суміші антибіотиків: II (Butzler) модифікована, IV (Preston) модифікована, селективна домішка для кампілобактерій модифікована (по Дойлу) та аеротолерантною домішкою, рекомендованими FDA. В якості аеротолерантної домішки до складу поживних середовищ рекомендовано додавати компоненти наступного складу: На півурат, На метабісульфіт, залізо (II) сульфат – по 6,25 г кожного.

Результати дослідження. За результатами досліджень встановлено, що при мінімальній дозі зараження м'ясного фаршу 1 КУО/г було виявлено перші ознаки росту культур кампілобактерій виду *C. jejuni* при дослідженні дозі за методом FDA (табл. 1). При контамінації м'ясного фаршу кампілобактеріями в дозі 100,0 КУО/г і більше відмінностей в результатах реізоляції даних мікроорганізмів після 24 годин на селективних поживних щільних середовищах за методами, що порівнювалися, не виявлено. Після 48 годин культивування перші ознаки росту культур *C. coli* було виявлено при рівні контамінації м'ясного фаршу в дозі 10,0 КУО/г. Слід зазначити, що через 24 години інкубації при дозі зараження м'ясного фаршу 100,0 КУО всі досліджувані культури мали ознаки росту на селективних поживних щільних середовищах: Abeuta-Hant-Bark agar (FDA) та на селективних середовищах mCCD агар і Preston (метод ISO). Ідентифікація реізолятів за видами була проведена на підставі тестів, рекомендованих міжнародним стандартом ДСТУ ISO 10272-1:2007 за показниками: виявлення каталази, гідролізу піпуратів, чутливість до налідиксової кислоти та цефалозину, виявлення ацетату індоксилилу.

Розділ 3. Ветеринарна мікробіологія та вірусологія

Таблиця 1 – Результати реізоляції кампілобактерій із експериментально контамінованого м'ясного фаршу

Доза зараження (КУО/г)	Ріст після 24 годин на селективному поживному щільному середовищі		Ріст після 48 годин на селективному поживному щільному середовищі	
	ISO jejuni/coli /lari	FD Ajejuni/coli/lari	ISO jejuni/coli/lari	FDA jejuni/coli/lari
1,0	- /-/-	+ /-/-	+ /-/-	+ /-/-
1,0	- /-/-	+ /-/-	+ /-/-	+ /-/-
1,0	- /-/-	+ /-/-	+ /-/-	+ /-/-
10,0	+ /-/-	+ /-/-	+ /+/-	+ /+/-
10,0	+ /-/-	+ /-/-	+ /+/-	+ /+/-
10,0	+ /-/-	+ /-/-	+ /+/-	+ /+/-
100,0	+ /+ /+	+ /+ /+	+ /+ /+	+ /+ /+
100,0	+ /+ /+	+ /+ /+	+ /+ /+	+ /+ /+
100,0	+ /+ /+	+ /+ /+	+ /+ /+	+ /+ /+
1000,0	+ /+ /+	+ /+ /+	+ /+ /+	+ /+ /+
1000,0	+ /+ /+	+ /+ /+	+ /+ /+	+ /+ /+
1000,0	+ /+ /+	+ /+ /+	+ /+ /+	+ /+ /+

Примітка: «+» – наявність росту культур; «-» – відсутність росту культур

Слід зазначити, що метод FDA мав перевагу в швидкості росту колоній при найменших дозах зараження і дозволяв одержувати результати в коротші терміни. Результати обох проведених методів досліджень дозволили обґрунтувати переваги методу FDA і доцільність використання його схеми, як основи для ізоляції кампілобактерій з харчових продуктів та сировини тваринного походження.

Зважаючи на значні матеріальні витрати ми провели удосконалення та адаптацію методу ізоляції кампілобактерій за методом FDA: кров коня замінили на стерильну дефібризовану кров барана, яка також має ростові і редуруючі властивості, а в якості середовища збагачення використовували тіогліколеве середовище з селективною домішкою (поліміксин В – 5000 ME; рифампіцин – 10 мг; триметоприм – 10 мг, циклогексимід – 100 мг із розрахунку на 1 літр поживного середовища), яка є подібною до селективної домішки (Preston). Модифікований метод FDA, показав достатньо високий рівень чутливості при дослідженні проб експериментально контамінованих харчових продуктів і дозволили виявити кампілобактерії в досліджуваних зразках на рівні 1 КУО/г (для *S. jejuni*), тобто відсутність збудника в 25 г продукту. Даний показник мікробіологічної оцінки ризику контамінації м'яса птиці патогенною мікрофлорою відповідає вітчизняним критеріям безпечності даного виду продуктів. Отримані результати свідчать про збереження стабільних біологічних властивостей ізолятів *Campylobacter spp.* Крім того, напіврідка консистенція тіогліколевого середовища забезпечувала додаткові мікроаерофільні умови для росту даних мікроорганізмів, що відзначалося більш інтенсивним ростом колоній кампілобактерій в порівнянні з висівом проб харчових продуктів у рідкі поживні середовища, ріст культур кампілобактерій мав більш характерні ознаки – сірувато-блакитний диск під поверхнею поживного середовища товщиною 1-4 мм, що дозволило ідентифікувати дані мікроорганізми за характерними морфологічними ознаками колоній та сприяти підвищенню ефективності досліджень.

За результатами проведених досліджень отримано патент на корисну модель № 50353 «Спосіб виділення мікроорганізмів роду *Campylobacter* із харчових продуктів». Даний спосіб може бути використаний при проведенні ветеринарно-санітарної експертизи продукції птахівництва на предмет контамінації кампілобактеріями з метою профілактики харчових токсикоінфекцій у людей при вживанні забруднених мікроорганізмами роду *Campylobacter* продуктів харчування.

Висновки. 1. Культуральні методи виділення *Campylobacter spp.*, з харчових продуктів за ДСТУ ISO 7218:1996 та ДСТУ ISO 10272-1:2006 достатньо ефективні, мають високу чутливість, а рівень відкриваємості проб складав 106,1-124,3 % та 102,1-119,2 %, відповідно. Показник реізоляції бактерій (%) прямопропорційно залежний від дози контамінації м'ясного фаршу і має тенденцію до збільшення при підвищенні дози зараження харчового продукту.

2. Схема ізоляції *Campylobacter spp.* за методом FDA має переваги в швидкості росту колоній при найменших дозах зараження – через 24 години культивування при дозі зараження 1,0 КУО/г, має вищі рівні реізоляції кампілобактерій з урахуванням дози кампілобактерій, що внесена в продукт (млн/см³): на 4,0 %; 4,0 %; 5,9 %; 5,9 %; 4,9 % в порядку зростання дози контамінації, відповідно.

Список 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. 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. Курако, У.М. Выделение и идентификация *Campylobacter jejuni* из продуктов убоя кур / У.М. Курако, А.А. Щербак // Идеи Пастера в борьбе с инфекциями: тезисы 4 Международной конференции, посвященной 85-летию Санкт-Петербургского НИИЭМ имени Пастера и 120-летию Парижского института Пастера, 2-4 июня 2008. – Санкт-Петербург, 2008. – С. 127.
4. Andersen, J.K. New strategies for the use of microbiological examinations in food control in Denmark / J. K. Andersen, T. Hald, N. L. Nielsen [and all] // Food Control. – 2007. – Vol. 18, Is. 3. – P. 273-277.
5. Food & Drug Administration «Isolation of *Campylobacter* Species from Food and Water» Bacteriological Analytical Manual Online. – <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/ban.7.html>.
6. Koenraad Petra M. F. J. Methods for the detection of *Campylobacter* in sewage: evaluation of efficacy of enrichment and isolation media, applicability of Polymerase Chain Reaction and Latex Agglutination Assay / Petra M. F. J. Koenraad, Belinda A. J. Giesendorf, Marleen H. C. Henkens, Rijkelt R. Beumer [and all.] // Journal of Microbiological Methods, Vol. 23, Is. 3 – 1995. – P. 309-320.
7. Skirrow, M.B. *Campylobacter*. *Campylobacteriosis* / M.B. Skirrow // Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. – 2003. – P. 790-795.
8. Wisessombat S. / A novel method and simple apparatus for the detection of thermophilic *Campylobacter spp.* in chicken meat products / S. Wisessombat, K. Kittinyom, P. Srimanote, W. Wonglumsom, S.P. Voravuthikunchai // Journal of Microbiological Methods. – Vol. 76, Is. 2. – 2009. – P. 169-173.

COMPARATIVE ESTIMATION OF EFFICIENCY OF METHODS OF SELECTION OF CAMPYLOBACTER SPP. FROM THE POULTRY PRODUCTS

Kasyanenko O.I., Fotina T.I.
Sumy National Agrarian University

Results of experimental researches concerning the study and comparative estimation of efficiency of charts of selection of *Campylobacter* spp. from the poultry products by the international standards are presented and analyzed in the article. As a result of researches there was conducted the estimation of efficiency of methods of investigation of avian meat as from the point of view of methodology and obtained results. This work is devoted to the decision of important task concerning the development of accessible and effective for practical researches of method (charts) of exposure of *Campylobacter* spp. in the poultry products with the use of developments of domestic and foreign laboratory diagnostics of campylobacteriosis.

УДК 619:576.535:578.822.2:636.4

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН НА ІЗОЛЯТИ ПАРВОВІРУСУ СВИНЕЙ

Кольчик О.В., Прохорятова О.В.

Національний Науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Уперше паровірус свиней виділив Майер та ін. у 1966 році з плоду свиноматки, що абортувала. У даному господарстві відмічали порушення репродуктивної функції у свиноматок – передчасні пологи, аборти, муміфікація плодів, народження нежиттєздатного приплоду. Протягом десятиків років багато науковців [Siegt G., 1973; Mengeling W.L, 1980; Bachmann P.A, 1975; Забережний А.Д., 1987] вивчали морфологічні, біохімічні, антигенні, культуральні властивості вірусу, встановили розповсюдження, джерела та шляхи передачі парвовірусної інфекції свиней [1, 2, 3, 4, 5]. Вченими були розроблені діагностичні та специфічні профілактичні засоби [6, 7, 8].

Реформування вітчизняного свинарства в останнє десятиріччя сприяло виникненню складних епізоотичних осередків з репродуктивним синдромом, етіологічним фактором яких є змішані вірус-бактеріальні збудники. Протиепізоотична регуляція таких інфекцій ускладнена. Моно парвовірусна інфекція свиней в останні роки зустрічається дуже рідко. Асоціювання різних вірусів у одному організмі свині може прискорювати еволюцію вірусів та впливати на зміну властивостей парвовірусу.

Таким чином, вивчення культуральних та біохімічних властивостей нових польових ізолятів парвовірусу свиней та порівняння їх властивостей з референтним штамом ПВС є актуальним.

Метою досліджень було вивчення біологічних властивостей двох ізолятів парвовірусу Е-2 та К-5 у порівнянні з референтним штамом *Nadle*, вплив на них хімічних факторів.

Матеріали і методи. Дослідження проводили в лабораторії вивчення хвороб свиней ННЦ «ІЕКВМ». При виконанні досліджень використовували перещеплювану лінію клітин нирки свині – РК-15, поживні культуральні середовища: Ігла модифіковане живильне (ДМЕМ) та 199 з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби нативної без консервантів, антибіотики (100 ОД/см³ пеніциліну та 100 мг/см³ стрептоміцину), 0,25 % розчин трипсину, 0,02 % розчин версену, глутамін сухий – 150 мг/500 см³ середовища, формаліну 10 % розчин, ефіру 10 %, етанолу 10 %, β-оксиетилендіаміну розчин з кінцевою концентрацією 0,1 %. В роботі використовували ізолят Е-2 парвовірусу свиней, виділений від поросят із господарства Полтавської області (2007 р.), К-5 – ізольований від тварин із свиного господарства Сумської області (2008 р.), референтний штам *Nadle* люб'язно предоставлений проф. З. Пейсаком (Національний ветеринарний дослідницький інститут, Польща, 2008 р.). Польові ізоляти Е-2 і К-5 ПВС задепоновані та зберігаються у депозитарії ДНКІБШМ. Для індикації вірусів використовували дводобові культури клітин із повністю сформованим моношаром. Інфікування культури клітин проводили 30 % вірусотримуючою суспензією і витримували за температури 37±0,5 °С протягом 2 години. За проявом цитопатичної дії спостерігали кожну добу.

Визначення інфекційної активності штамів парвовірусу Е-2 і К-5, референтного штаму *Nadle* проводили за методом Ріда і Менча при культивуванні на культурі клітин РК-15, застосовували дводобові культури із сформованим моношаром. Інфікували вірусами по 6 пробірок (на кожне розведення) та 6 пробірок (контроль культури клітин) у 10-кратному розведенні від 10⁻¹ до 10⁻⁸. Облік результатів зараження проводили щоденно протягом 6 діб за наявністю або відсутністю цитопатогенної дії вірусів.

Результати досліджень. У 2010 р. були проведені дослідження по вивченню впливу хімічних факторів на інфекційну активність двох парвовірусних штамів К-5, Е-2 та референтного штаму *Nadle*.

Передпроведенням експерименту була визначена інфекційна активність кожного ізоляту ПВС, яка складала: Е-2-5, 12 Іг ТЦД_{50/0,2мл}, К-5 - 7,18 Іг ТЦД_{50/0,2мл}, *Nadle* - 7,36 Іг ТЦД_{50/0,2мл}.

При вивченні впливу хімічних факторів проводили обробку 3 штамів парвовірусу 10 % розчином хлороформу, який вносили у вірусну суспензію, витримували 30 хвилин за умов кімнатної температури (18±20) °С. Після цього визначали інфекційний титр вірусів. Дія ефіру з концентрацією 10 % на парвовірус свиней, етанолу 10 %, β-оксиетилендіаміна з кінцевою концентрацією 0,1 % перевіряли аналогічно. Починаючи з 3 доби спостерігали цитопатичну дію парвовірусів. ЦПД проявлялась з локального округлення клітин, відділенням від скла та повним руйнуванням моношару. За результатами дослідів проводили розрахунок інфекційної активності за методом Ріда та Менча.

Результати визначення інфекційної активності парвовірусів представлені у таблиці.

За результатами проведених досліджень встановлено, що ізоляти парвовірусів К-5, Е-2 та референтний штам *Nadle* при обробці 10 % розчином хлороформу з експозицією 30 хвилин зберігали інфекційну активність. Так, до проведення дослідів та після впливу хімічної речовини, а також у контролі титри інфекційної активності вірусів вірогідно не відрізнялись – К-5 - 7,18, 7,23, 7,68 Іг ТЦД_{50/0,2мл}, Е-2 - 5,12, 5,10, 5,32 Іг ТЦД_{50/0,2мл}; референтний штам «*Nadle*» – 7,36, 7,26, 7,74 Іг ТЦД_{50/0,2мл} відповідно.

Інфекційність штамів ПВС К-5, Е-2 та *Nadle* не знижувалась при дії на них 10 % ефіру та етанолу в концентрації 10 %.

Інфекційна активність трьох штамів вірусів до обробки їх β-оксиетилендіаміном з кінцевою концентрацією – 0,1 % протягом 1 години за температури (37±0,5) °С складала для К-5 - 7,36 Іг ТЦД_{50/0,2мл}, Е-2 - 5,14 Іг ТЦД_{50/0,2мл}, *Nadle* - 7,48 Іг ТЦД_{50/0,2мл}. Після обробки 0,1 % розчином β-оксиетилендіаміну парвовірусні штами не втрачали інфекційної активності та мали титр: К-5 - 7,02 Іг ТЦД_{50/0,2мл}, Е-2 - 4,82 Іг ТЦД_{50/0,2мл}, *Nadle* - 6,98 Іг ТЦД_{50/0,2мл} відповідно.

Таким чином, досліджувані штами парвовірусу свиней проявили стійкість щодо обробки 10 % хлороформом, 10 % ефіром, 10 % етанолом та 0,1 % розчином β-оксиетилендіаміну, що характеризувалося збереженням інфекційної активності. Це пояснюється відсутністю у парвовірусу ліпопротеїдної оболонки і нечутливістю до цих органічних розчинників.