

2. На основі проведеного аналізу геномів вище перелічених сальмонел розраховані праймери, що отримали назву: *Styphi_F/R* – для *Salmonella Typhi* (738 п.н.), *Sdub_F/R* – для *Salmonella Dublin* (203 п.н.), *Sgal_F/R* – для *Salmonella Gallinarum* (97 п.н.).

Перспективи для подальших досліджень. На основі одержаних розрахунків планується синтезувати праймери та відпрацювати протокол проведення полімеразної ланцюгової реакції з їх використанням у практичних умовах.

Список літератури

1. Герілович, А.П. Розробка олігонуклеотидних систем для виявлення сальмонел у біологічних об'єктах [Текст] / А.П. Герілович, В.Л. Ареф'єв, С.І. Вовк // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2011. – Вип. 95. – С. 47–49.
2. Ареф'єв, В.Л. Разработка методики индикации ДНК сальмонелл и идентификации серологических вариантов *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* на основе полимеразной цепной реакции. [Текст] / В.Л. Ареф'єв // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2012. – Вип. 96. – С. 77–80.
3. Герілович, А.П. Методологія розрахунку та теоретичної перевірки якості олігонуклеотидів для виявлення нуклеїнових кислот патогенів тварин на основі полімеразної ланцюгової реакції [Текст] / А.П. Герілович // Вет. біотехнологія : бюл. / IBM. – К., 2009. – № 14. – С. 56–59.
4. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях [Текст] / А.П. Герілович [та ін.] ; під заг. ред. Б.Т. Стегнія, А.П. Геріловича. – Х., ННЦ «ІЕКВМ». – 258 с.
5. PCR multiplex for detection of *Salmonella Enteritidis*, *Typhi* and *Typhimurium* and occurrence in poultry meat [Text] / Camila Guimaraes de Freitas [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2010. – Vol. 139. – P. 15–22.
6. Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, *Typhimurium*, *Choleraesuis*, *Infantis*, *Hadar*, *Enteritidis*, *Dublin* and *Gallinarum*, by multiplex PCR [Text] / A. Masato [et al.] // J. Microbiol. Meth. – 2011. – Vol. 85. – P. 9–15.
7. Simone Alves Mendes Ribeiro. Molecular differentiation between *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *pullorum* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *gallinarum* [Text] / Simone Alves Mendes Ribeiro // Brazil. J. Microbiol. – 2009. – Vol. 40. – P. 184–188.
8. Multiplex PCR for the concurrent detection and differentiation of *Salmonella* spp., *Salmonella Typhi* and *Salmonella Typhimurium* [Text] / Chai Fung Pui [et al.] // Trop. Med. Health. – 2011. – Vol. 39, № 1. – P. 9–15.

DESIGN OF THE OLIGONUCLEOTIDE SEQUENCES FOR GENOTYPING OF DIFFERENT SPECIES OF SALMONELLA

Arefyev V.L., Gerilovich A.P.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

*The analysis of genomic maps for searching oligonucleotide sequences for *Salmonella Typhi*, *Salmonella Dublin*, *Salmonella Gallinarum* was done. On the base of this study new primers for PCR typing of the above mentioned *Salmonella* species were selected by NSC "IECVM".*

УДК 619.616.98:579.843

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОЛЬОВИХ ІЗОЛЯТІВ І МУЗЕЙНИХ ШТАМІВ КАМПІЛОБАКТЕРІЙ

Бабкін А.Ф., Обуховська О.В., Куценко В.А., Калініченко Т.В.

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

Кампілобактеріоз – зоонозна інфекційна хвороба багатьох видів тварин і людей, яка характеризується поліморфністю проявів (враженням статевих органів, тимчасовим безпліддям, абортми, мертвонародженістю, враженням шлунково-кишкового тракту). Збудником хвороби являються бактерії роду *Campylobacter*. За даними на 2012 р. рід *Campylobacter* об'єднує 14 видів. При цьому для сільськогосподарських тварин і людей найбільше етіологічне значення мають види *C. jejuni* та *C. Coli* [1, 2]

За даними ВООЗ, кампілобактеріоз широко розповсюджений у світі та обумовлює до 15 % усіх гострих кишкових інфекцій тварин і людей. Найбільш суттєвими природними резервуарами збудників кампілобактеріозу є свійські, сільськогосподарські тварини та птиця. Захворювання спричиняє значні економічні збитки тваринницьким закладам за рахунок недотримання приплоду та втрати дорослими тваринами своїх репродуктивних якостей.

На сьогоднішній день відсутні вітчизняні засоби діагностики та профілактики кампілобактеріозу тварин. Головною умовою створення ефективних діагностиків і вакцин є наявність стабільних виробничих штамів. Тому актуальним напрямом роботи для вітчизняних фахівців ветеринарної медицини є ізоляція польових культур кампілобактерій та вивчення їх біологічних властивостей з метою визначення перспективних виробничих штамів [4].

Матеріали та методи. Дослідження проводили в лабораторії вивчення бруцельозу ННЦ «ІЕКВМ» упродовж 2011–2012 рр. Усього було досліджено 253 проби патологічного матеріалу від птиці різних вікових груп з 10 птахогосподарств, а також 10 проб патологічного матеріалу від ВРХ з 4 господарств різних областей України. При цьому визначали морфологічні, культуральні, біохімічні та антибіотикорезистентні властивості культур. Для дослідження від птиці відбирали жовчний міхур, печінку, сліпі відрізки кишечнику; від ВРХ – аборт плоди.

Проби патологічного матеріалу та деліюфілізовані культури кампілобактерій висівали на поживні середовища – МПБ, НРА з антибіотиками (цефалотин, фузидін), МПА, середовище Ендо, кампілобакагар, кров'яний кампілобакагар. Висіви культивували в мікроаерофільних умовах (5 % кисню, 10 % CO₂, 85 % азоту) за температури 42 °C та 37 °C упродовж 72 годин. Облік росту здійснювали кожну добу візуально, на 3 добу – шляхом мікроскопії мазків.

За умов виявлення характерного росту у вигляді дрібних, прозорих з сіруватим відтінком колоній на МПА та у вигляді сіро-блакитного кільця на поверхні НРА, здійснювали мікроскопію мазків (фарбування за Грамом та Стемпом). При виявленні в мазках типової для кампілобактерій морфології (Г-, спірально зігнуті, S-подібні палички) проводили подальші висіви на диференційній середовища з метою отримання чистої культури та її типізації.

Супутня мікрофлора, яка була ізольована в процесі досліджень, була типована до виду за стандартними методиками.

Окрім польових ізолятів вивчали властивості музейних культур кампілобактерій, що зберігались у ліофілізованому стані впродовж тривалих строків.

Результати досліджень. У результаті бактеріологічних досліджень патологічного матеріалу від 253 голів птиці із клінічними ознаками типовими для кампілобактеріозу (пригнічений стан, стійка діарея) та від 10 аборт плодів ВРХ нами було ізольовано та вивчено 345 культур мікроорганізмів. Найбільш питому вагу серед них займали *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*.

З метою ізоляції польових культур кампілобактерій досліджували матеріал від птиці та ВРХ з 14 господарств п'яти різних областей України.

Результати досліджень наведено в таблицях 1 та 2.

Таблиця 1 – Ізоляція бактеріальної мікрофлори з проб патологічного матеріалу від птиці

№ з/п	Проби патологічного матеріалу	Вік птиці		
		Добові курчата	Бройлери (до 30 діб)	Доросла птиця
1.	Печінка	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	<i>Campylobacter spp.</i> , <i>Escherichia coli</i>
2.	Жовчний міхур	<i>Escherichia coli</i>	<i>Campylobacter spp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	<i>Campylobacter spp.</i> , <i>Escherichia coli</i>
3.	Вміст сліпих відрізків кишечника	<i>Escherichia coli</i>	<i>Campylobacter spp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	<i>Campylobacter spp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i>
4.	Вміст шлунку	—	<i>Escherichia coli</i>	—

Як видно з матеріалів таблиці кампілобактерії ізолювали з печінки, жовчі та вмісту сліпих відрізків кишечника. Дослідження вмісту шлунку були неефективними. Також було встановлено, що в більшості випадків носіями збудника є бройлери у віці до 30 діб та дорослі кури – несучки. Від добових курчат кампілобактерії не були ізолювані.

У цілому, наявність циркуляції польових ізолятів кампілобактерій було встановлено в 3 з 10 обстежених птахогосподарств з 3 різних областей України. Таким чином, близько 30 % з обстеженого птахопоголов'я є носіями цих збудників.

Таблиця 2 – Ізоляція бактеріальної мікрофлори з проб патологічного матеріалу від ВРХ

№ з/п	Проби пат. мат-лу	Печінка	Вміст сичуга	Жовчний міхур	Селезінка	Легені	Серце
1.	Аборт плод	-	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>
2.	Аборт плод	-	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>
3.	Аборт плод	<i>C.f.venerialis</i>	-	<i>C.f.venerialis</i>	-	-	-
4.	Аборт плод	<i>C.f.venerialis</i>	-	<i>C.f.venerialis</i>	-	-	-
5.	Аборт плод	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
6.	Аборт плод	-	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	<i>Edwardsiella ictaluri</i>
7.	Аборт плод	-	<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	-	<i>Enterobacter agglomerans</i>
8.	Аборт плод	-	<i>E. Coli</i>	<i>Pasteurella</i>	-	-	<i>Pasteurella</i>
9.	Аборт плод	-	<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>
10.	Аборт плод	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-

Як видно з матеріалів таблиці кампілобактерії ізолювали з печінки та жовчі. Дослідження вмісту шлунку селезінки, легенів були неефективними. У цілому, наявність циркуляції польових ізолятів кампілобактерій було встановлено в 2 з 10 обстежених аборт плодів. Таким чином, 20 % з обстеженого поголів'я ВРХ виявилось носіями цих збудників. У всіх випадках нами було виявлено асоційований перебіг інфекції.

Встановлено, що супутня мікрофлора представлена ентеробактеріями та грампозитивними коками. При цьому найбільша питома вага припадала на *Escherichia coli* (41,6 %) та *Enterobacter agglomerans* (33,3 %), щодо кокової мікрофлори, то виявляли високовірулентні види, зокрема *Staphylococcus aureus* (від добових курчат).

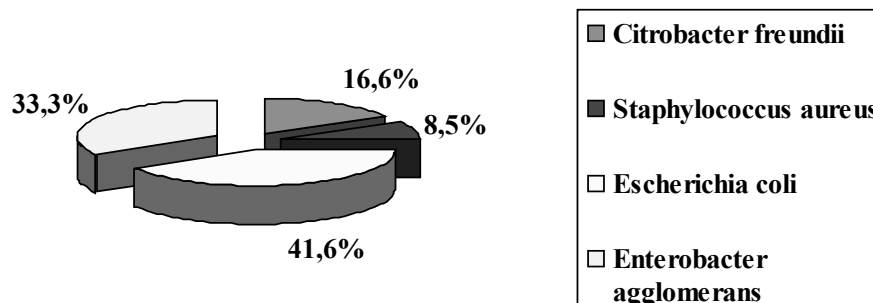


Рис. 1. Склад супутньої мікрофлори при проведенні досліджень на кампілобактеріоз

У подальшому було проведено серію дослідів щодо вивчення культуральних і біохімічних властивостей культур кампілобактерій, які знаходились в музеї нашої лабораторії. Результати наведено в таблиці 3.

Окремі автори стверджують, що лікування тварин з патологіями, спричиненими кампілобактеріями, ускладнюється тим, що ці мікроорганізми виявляють дуже низьку чутливість до багатьох нині існуючих антибіотиків.[3, 5, 7]. Тому ми вивчили чутливість трьох музейних культур кампілобактерій до широкого спектру антибактеріальних препаратів. Результати наведено в таблиці 4.

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

Таблиця 3 – Біохімічні та культуральні властивості кампілобактерій

№ з/п	Тести	<i>C. fetus subsp. fetus</i> 150є	<i>C. fetus subsp. venerealis</i> 6913	<i>C. jejuni subsp. jejuni</i> 5779
1.	Каталаза	+	+	+
2.	Ріст за: 15°C 25°C 37°C 42°C	- + + +/-	- + + -	- - - +
3.	Ріст на НРА з 1 % гліцину	-	+	+
4.	Ріст на НРА з 1 % жовчі	+	+	+
5.	Ріст на НРА з 3,2 % цистеїну	+	+	+
6.	Ріст на НРА з 1,5 % NaCl	-	-	-
7.	Чутливість до: налідіксової к-ти цефалотину	- +	- +	+ -
8.	Утворення H ₂ S	+	+	+
9.	Утворення індолу	-	-	-
10.	Гідроліз гіпурату	-	-	+
11.	Ресселя	-	-	-

Примітки: + – наявність росту; - – відсутність росту; +/- – незначний ріст

Таблиця 4 – Чутливість культур кампілобактерій до антибіотиків

№ ч/ч	Антибіотик	<i>C. jejuni subsp. jejuni</i> 5779	<i>C. fetus subsp. fetus</i> 150є	<i>C. fetus subsp. venerealis</i> 6913
1.	Пеніцилін	-	-	-
2.	Стрептоміцин	-	-	-
3.	Ампіцилін	+	+	+
4.	Оксацилін	+	+	+
5.	Еритроміцин	+	+	+
6.	Гентаміцин	+	+	+
7.	Левоміцетин	-	-	-
8.	Тетрациклін	+	+	+
9.	Олеандоміцин	+	+	+
10.	Поліміксин	-	-	-
11.	Рифампіцин	-	-	-
12.	Фузидін	-	-	-
13.	Цефазолін	-	-	-
14.	Цефтриаксон	-	-	-
15.	Енрофлоксацин	+	+	+
16.	Офлоксацин	+	+	+
17.	Доксициклін	+	+	+
18.	Колістіна-сульфат	-	-	-
19.	Докситіл	+	+	+
20.	Фторфенікол	+	+	+
21.	Тримікозин	+	+	+
22.	Ампікол	-	-	-
23.	Тримекол	+	+	+
24.	Спелімікс	+	+	+
25.	Трифлон	+	+	+
26.	Ванкоміцин	-	-	-
27.	Триметоприм	-	-	-
28.	Амфотерицин	-	-	-
29.	Цефалотин	-	-	-
30.	Бацитрацин	-	-	-
31.	Новобіоцин	-	-	-
32.	Рістоміцин	-	-	-
33.	Цефоперазон	-	-	-
34.	Циклогексимід	-	-	-
35.	Цефсулодин	-	-	-

Примітки: 1. «+» – висока чутливість; 2. «-» – відсутність чутливості

За результатами наших досліджень встановлено, що культури кампілобактерій виявилися не чутливими до широкого спектру антибактеріальних препаратів, які широко застосовуються в практиці ветеринарної медицини. Так, усі кампілобактерії були нечутливі до пеніциліну, стрептоміцину, левоміцетину, поліміксину, рифампіцину, фузидіну, цефазоліну, цефтриаксону, колістіна-сульфату, ампіколу, ванкомицину, триметоприму, амфотерицину, цефалотину, бацитрацину, новобіоцину, рістоміцину, цефалоперазону, циклогексиміду, цефсулодіну. Але були високочутливими до енрофлоксацину, офлоксацину, доксицикліну, еритроміцину та гентаміцину.

Висновки. 1. Встановлена циркуляція збудників кампілобактеріозу в 30 % дослідженого поголів'я птиці та 20 % – ВРХ відповідно.

2. У більшості випадків збудників кампілобактеріозу виділяли у складі мікробних асоціацій. При цьому супутня мікрофлора представлена ентеробактеріями (*E. coli*, *E. agglomerans*, *C. freundii*) та грампозитивними коками (*S. aureus*).

3. Найбільшу чутливість кампілобактерій реєстрували по відношенню до антибіотиків груп фторхінолонів та аміноглікозидів.

Перспективи подальших досліджень. З метою визначення перспективних виробничих штамів кампілобактерій необхідно продовжити вивчення біологічних характеристик відібраних нами культур у напрямі з'ясування антигенних і вірулентних властивостей.

Список літератури

1. Бабкин, А.Ф. Изучение выживаемости кампилобактерий, хранящихся в лиофильном состоянии на питательных средах [Текст] / А.Ф. Бабкин, Н.И. Галищев, Д.С. Новаковский // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2002. – Вип. 80. – С. 42–47.
2. Бабкин, А.Ф. Культурально-биохимические свойства кампилобактеров и получение моноспецифических сывороток [Текст] / А.Ф. Бабкин, Н.И. Галищев, Д.С. Новаковский // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2003. – Вип. 81. – С. 25–33.
3. Жованик, П.М. Результаты вивчення вібриозу великої рогатої худоби в господарствах України [Текст] / П.М. Жованик, Г.В. Алфімова, І.М. Скулін // Ветеринарія : міжвід. темат. наук. зб. – К. : Урожай, 1968. – Вип. 16. – С. 95–103.
4. Кирьянов, Е.В. Кампилобактериоз животных [Текст] : лекция / Е.В. Кирьянов / Приморский с.-х. ин-т. – Уссурийск, 1992. – 23 с.
5. Новаковский, Д.С. Кампілобактеріоз: вивчення проблеми (літ. огляд) [Текст] / Д.С. Новаковский // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2004. – Вип. 84. – С. 531–536.
6. Сахацька, О.І. Удосконалення методів діагностики та профілактики кампілобактеріозу птиці [Текст] : автореф. дис. канд. вет. наук / О.І. Сахацька ; Ін-т експерим. і клініч. вет. медицини. – Х., 2005. – 20 с.
7. Скулін, І.М. Серологічна ідентифікація кампілобактерій ізольованих від ВРХ [Текст] / І.М. Скулін, М.Г. Галищев // Ветеринарія : міжвід. темат. наук. зб. – К., Урожай, 1981. – Вип. 54. – С. 12–14.
8. O'Brien, T. Factory Farming and Human Health [Text] / T. O'Brien // Hants, Compassion in World Farming Trust. – 1997. – P. 8–9.

STUDING OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF CAMPYLOBACTER FIELD ISOLATES AND MUSEUM STRAINS

Babkin A.F., Obuhovska O.V., Kutzenko V.A., Kalinichenko T.V.

National Scientific Center «Institute of experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

*Bacteriological investigations were performed in 14 livestock and poultry farms of five regions of Ukraine. It was shown the presence of circulating of Campylobacter in 30 % of the investigated poultry livestock and 20 % – of cattle, respectively. It was found that in most cases, Campylobacter was isolated in the microbial associations. Associated microflora was represented Enterobacteriaceae (*E. coli*, *E. agglomerans*, *C. freundii*) and gram-positive cocci (*S. aureus*). It was studied the biological properties of Campylobacter field isolates and museum strains. It was revealed that the most sensitive Campylobacter show towards antibiotics of group fluoroquinolones and aminoglycosides.*

УДК 619:616.98:616.682-002

ПОРІВНЯЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПАНЕЛІ СИРОВАТОК ДЛЯ КОНТРОЛЮ СЕРОЛОГІЧНИХ РЕАКЦІЙ (РТЗК, РЗК І м-РЗК) У ДІАГНОСТИЦІ *BRUCELLA OVIS* ІНФЕКЦІЇ

Близнецов О.Г., Бабкін А.Ф., Обуховська О.В., Іванов Г.Б.

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

Епізоотологічний моніторинг благополуччя з інфекційного епідемії баранів згідно чинних нормативних документів в Україні здійснюють серологічними скринінговими дослідженнями в РТЗК та РІД. За кордоном застосовують РЗК, ІФА, РІД [1-8].

Порівняльні дослідження робочої панелі сироваток крові баранів для контролю серологічних реакцій (РТЗК, РЗК, м-РЗК) проведени з метою визначення чутливості за титрами антитіл і специфічності зазначених реакцій. Досліджено також ідентичність за активністю та чутливістю бруцеллаовісних антигенів і контрольних сироваток діагностичних наборів виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина» та VLA Weybridge.

У РТЗК і РЗК застосовували візуальний облік результатів з визначенням ступеня затримки гемолізу в хрестах (++++, +++, ++, +), а в м-РЗК – інструментальний із застосуванням спектрофотометричного (СФМ) цифрового обчислення оптичної екстинкції (ОЕ) та комп'ютерної документальної реєстрації протоколу дослідження.

Матеріали та методи досліджень. Досліджено 20 проб сироваток крові від здорових тварин, 5 від хворих баранів і робоча панель сироваток, виготовлена з 8-и позитивних сироваток крові від тварин з бактеріологічно підтвердженим діагнозом і двох негативних проб. Ідентичність вітчизняних і закордонних діагностиків провели з антигеном і позитивною сироваткою виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина» (Україна) та VLA Weybridge (United Kingdom).

Випробування були проведені із застосуванням таких комерційних діагностиків:

- бруцеллаовісний антиген і контрольна позитивна сироватка VLA Weybridge;
- бруцеллаовісний антиген і контрольні сироватки з «Набору компонентів для серологічної діагностики інфекційного епідемії баранів в РТЗК», серія 1 2012 р., виробник ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»;
- «Сироватка крові кроля гемолітичної (гемолізіну) для реакції зв'язування комплекменту (РЗК)», серія 1 2012 р., виробник ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина» у подвійному титрі (1:600);
- «Комплемент сухий морської свинки», серія 1 2012 р., виробник ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»;
- індикаторна гемолітична система: 3 %-ва завись відмитих розчинником еритроцитів барана, сенсibiliзована в рівних об'ємах із робочим розведенням гемолізіну. У РЗК, м-РЗК та РТЗК використали відтитровану дозу комплекменту, 2 гемолітичні одиниці в перших двох реакціях та 3 ГО у РТЗК;
- компоненти реакції розводили розчинником (0,85 % розчин NaCl).