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. Rezyumeta 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 коагулазнойактивности 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 Кассіч В. Ю.
Дата надходження до редакції: 02.12.2015 р.

УДК 636.09:579.84:303.64

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

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, обладання 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-

ку ідентифікацію збудників у випадку гострих форм захворювання, але й забезпечити виявлення їх у продуктах тваринного походження та в тварин, які являються природніми резервуарами збудника. В даній статті викладені результати випробувань специфічності ПЛР тест-системи "Campylobacter spp.-ПЛР-ТЕСТ" для виявлення та ідентифікації ДНК бактерій роду Campylobacter в об'єктах навколишнього середовища та клінічних матеріалах на базі відділу молекулярної біології та імунохімії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Ключові слова: *кампілобактеріоз, тест-система, полімеразна ланцюгова реакція, матеріал, обєкти навколишнього середовища, випробування.*

Постановка проблеми у загальному вигляді. 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 [1]. Ця задача диктується необхідністю включення мікробіологічних досліджень в систему профілактики ГКІ, а також проведення моніторингу патогенних мікроорганізмів у харчових продуктах. Такий моніторинг повинен базуватися на використанні високоспецифічних кількісних методів. Особливо це потрібно для контролю ефективності протиепідемічних заходів на підприємствах, що працюють з сирими продуктами, з метою зниження перехресної забрудненості, що особливо важливо в разі виявлення кампілобактерій в харчових продуктах [2].

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання проблеми. Кампілобактеріоз (Campylobacteriosis) – інфекційне антропозоонозне захворювання, яке характеризується гострим перебігом, загальною інтоксикацією та ураженням переважно шлунково-кишкового тракту і можливою генералізацією патологічного процесу. Так у людей кампілобактерії потрапляють в організм частіше з контамінованими продуктами харчування тваринного походження. Із поміж усіх кампілобактерій найбільш значимими в розвитку захворювання у людей є Campylobacter jejuni, lari, coli [3].

У промислово розвинених країнах C. jejuni вважаються однією з першопричин виникнення захворювань з ознаками діареї як у дітей, так і у дорослих. Найбільшому ризику щодо захворювання на кампілобактеріоз підлягають діти у віці до одного року, з віком у дітей спостерігається помірне, але достатньо інтенсивне зниження захворюваності [3].

Передача збудника до здорової людини може проходити через продукти харчування та з водою, а також контактно-побутовим шляхом у сімейних або лікарняних вогнищах і при безпосередньому контакті з хворими тваринами. Отже суттєва роль у профілактиці кампілобактеріозу належить дотриманню санітарних правил на підприємствах де проходить кулінарна обробка та реалізація продуктів харчування тваринного походження.

Тому ефективним сучасним методом швидкої діагностики кампілобактеріозу є полімеразна ланцюгова реакція. За допомогою цього методу можливо не тільки здійснювати швидку ідентифікацію збудників у випадку гострих форм захворювання, але й забезпечити виявлення їх у продуктах тваринного походження та в тварин, які являються природніми резервуарами збудника.

Оскільки Campylobacter spp. дуже чутливий до умов культивування (наявність CO_2 і кисню, наявність крові, селективних домішок), культуральні методи їх аналізу досить трудомісткі і багатоетапні. При цьому завжди є ризик втрати кампілобактерій через порушення умов інкубації або присутності великої кількості сторонньої мікрофлори [4].

Сучасні методи молекулярно-генетичного аналізу, засновані на виявленні специфічних для шуканих мікроорганізмів нуклеотидних по- послідовностей ДНК, значно розширюють можливості виявлення у харчових продуктах важко культивованих патогенних мікроорганізмів [5].

Метою нашої **роботи** було випробування специфічності розробленої ПЛР тест-системи "Campylobacter spp.-ПЛР-ТЕСТ" для виявлення та ідентифікації ДНК бактерій роду Campylobacter в об'єктах навколишнього середовища та клінічних матеріалах.

Матеріали і методи досліджень. ПЛР проводили на чотирьохканальному ампліфікаторі "Терцик" виробництва НВФ "ДНК-Технологія" (Росія, м. Москва). До складу тест-системи для проведення 55 аналізів, включаючи контрольні зразки, входить набір реактивів для виділення ДНК та набір реактивів для проведення ПЛР на виявлення ДНК бактерій роду Campylobacter spp.; набір реактивів для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР. Для виділення ДНК був взятий метод лізису клітин гуанідинтіоционатом з наступною сорбцією ДНК на сорбенті.

Розроблений діагностичний набір на основі ПЛР спрямований на швидке виявлення ДНК мікроорганізмів роду Campylobacter spp., (ампліфікація консервативної ділянки гену (16S-F1; 16S-R2) в біологічних матеріалах.

Пошук нуклеотидних послідовностей проводили за базами даних GeneBank, EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека), DDBJ (Японська база даних нуклеотидних послідовностей) і Entrez (Національний центр біотехнологічної інформації, США).

Результати власних досліджень. Оскільки Campylobacter spp. дуже чутливий до умов культивування (наявність CO_2 і кисню, наявність крові, селективних домішок), культуральні методи

їх аналізу досить трудомісткі і багатоетапні. При цьому завжди є ризик втрати кампілобактерій через порушення умов інкубації або присутності великої кількості сторонньої мікрофлори.

Основою для розробки нових методів діагностики кампілобактеріозу стали результати аналізу даних літератури та результатів власних досліджень, які переконливо свідчили про перспективність використання методу на основі ПЛР для визначення наявності або відсутності збудника Campylobacter spp. та моніторингу хвороби у патологічному матеріалі, об'єктах зовнішнього середовища та продуктах харчування.

Розроблена нами тест-система, призначена для виявлення та ідентифікації ДНК бактерій Campylobacter методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) "Campylobacter spp.-ПЛР-ТЕСТ".

Для виконання ПЛР використовували два синтетичних олігонуклеотидних праймера, які вибирали таким чином, що вони є комплементарними двом ланцюгам специфічного фрагменту ДНК. Правильний вибір олігонуклеотидних праймерів визначає ефективність і відтворюваність ПЛР.

Розроблені праймери 16S-F1 та 16S-R2 створювались у відповідності до всіх вимог, теоретично мають високу специфічність для зв`язування із ділянками матричної ДНК, не мають критичної гомології з іншими бактеріями, вірусами.

В основі методу лежить виділення з досліджуваного зразку бактеріальної ДНК, проведення ампліфікації специфічної ділянки ДНК Campylobacter spp. при використанні специфічних олігонуклеотидних праймерів і синтезу комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ферменту Taq-полімерази. Детекція продуктів ПЛР здійснюється методом електрофорезу в агарозному гелі. Специфічні олігонуклеотидні праймери з наступною послідовністю нуклеотидів та температурних режимів (табл. 1). Довжина ампліфікованого специфічного фрагменту ДНК Campylobacter spp. – 319 п.н.

Таблиця 1

Температурні режими ампліфікатора

Ампліфікатори з регулюванням температури по матриці (термоблоку)	Ампліфікатори з активним регулюванням температури (у середині реакційної пробірки або по математичному алгоритму)
1 цикл – за температури 95° С – 4 хвилин	1 цикл – за температури 95° С – 4 хвилини
2 цикл – за температури 95° С – 1 хвилина	2 цикл – за температури 95° С – 30 секунд
за температури 60° С – 1хвилина	за температури 60° С –30секунд
за температури 72° С – 2хвилина	за температури 72° С –30секунд
Цикл 2 повторюють 35 разів	Цикл 2 повторюють 35 разів
3 цикл - за температури 72° С – 7 хвилин	3 цикл - за температури 72° С – 4 хвилини
4 цикл - за температури 10° С – збереження	4 цикл - за температури 10° С – зберігання

Для перевірки таксономічної специфічності тест-системи були використані штами бактерій Salmonella, Esherichia coli, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus. Ці мікроорганізми представленою тест-системою не виявляються (Рис.1, 2). На рисунку дуже яскраво світиться позитивний зразок Campylobacter spp. (Campylobacter jejuni), довжина фрагменту 319 п.н. Інші зразки не дають свічіння на даній висоті і тому вважаються негативними.

Чутливість тест-системи визначали на різних розведеннях ДНК контрольного зразка Campylobacter jejuni: 10^{-8} g DNA; 10^{-9} g DNA; 10^{-10} g DNA; 10^{-11} g DNA; 10^{-12} g DNA.

Чутливість даної тест-систем для детекції Campylobacter jejuni становить 10^{-11} g DNA.

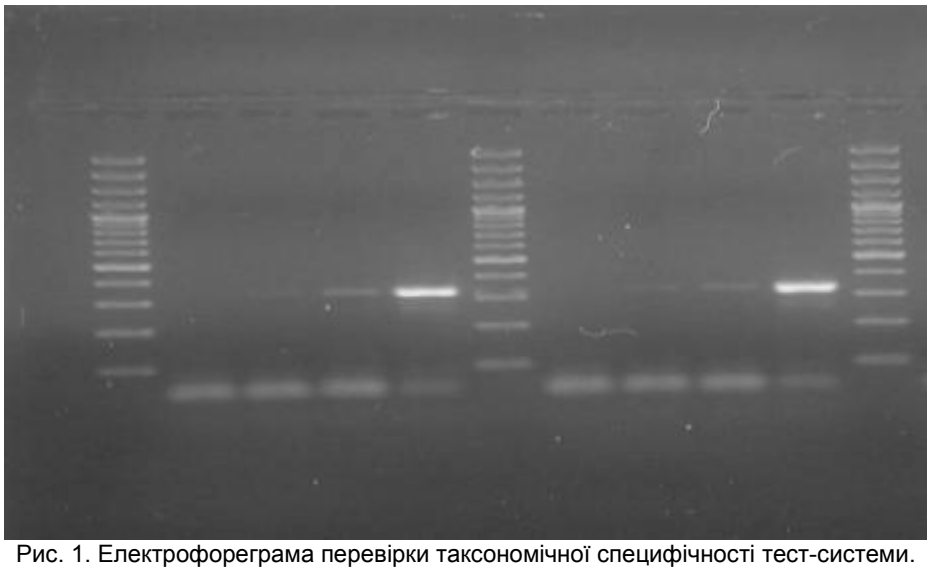

Рис. 1. Електрофореграма перевірки таксономічної специфічності тест-системи.

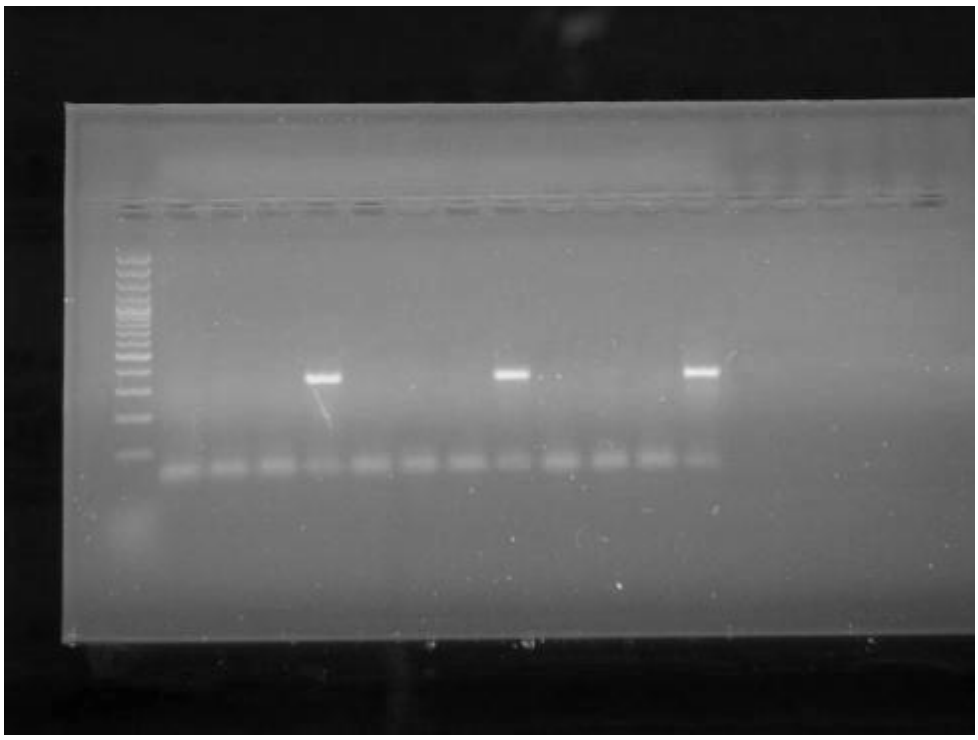

Рис. 2. Визначення специфічності розробленої тест-системи.

Було проведено дослідження специфічності розробленої тест-системи. Для цього були відібрані проби (фекалії, сперма, підстилка, вода, силос, комбікорм, товстий і тонкий кишківник, змиви з тушок, кліток, обладнання, ящиків, поїлок) для виявлення збудника кампілобактеріозу Campylobacter spp. (Рис. 3). На даному рисунку показана позитивна реакція досліджуваних проб, довжина фрагменту відповідає 319 п.н., що свідчить про наявність Campylobacter spp. Дослідження проводили паралельно на двох тест – системах: “Campylobacter spp.-ПЛР-ТЕСТ” розробки Державного науково – контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів і АмплиСенс® Campylobacter spp-EPh (Москва, Центральний науково-дослідний інститут епідеміології МОЗ РФ). Перевагою нашої тест-системи є безпечність та висока специфічність.

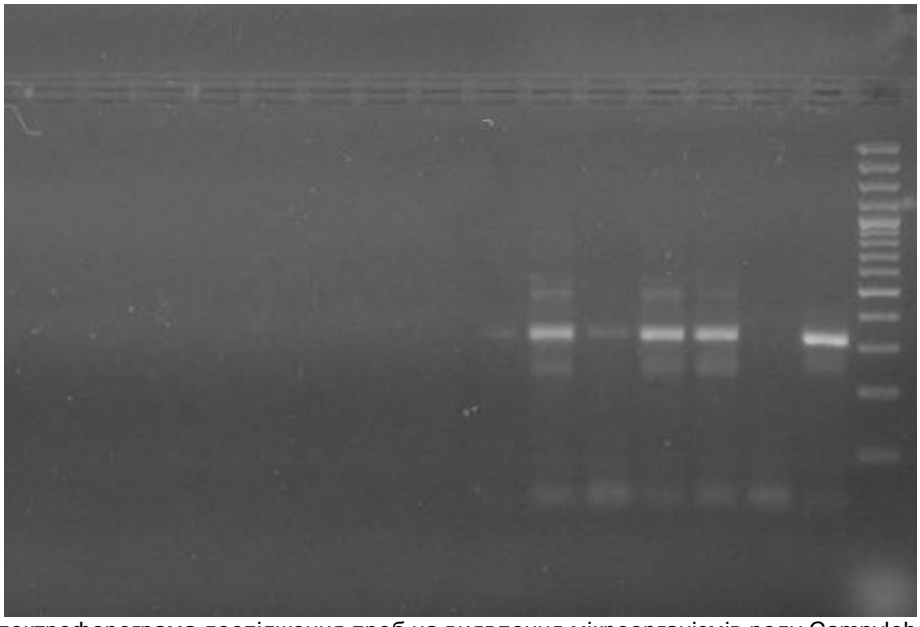

Рис. 3. Електрофореграма дослідження проб на виявлення мікроорганізмів роду Campylobacter spp.

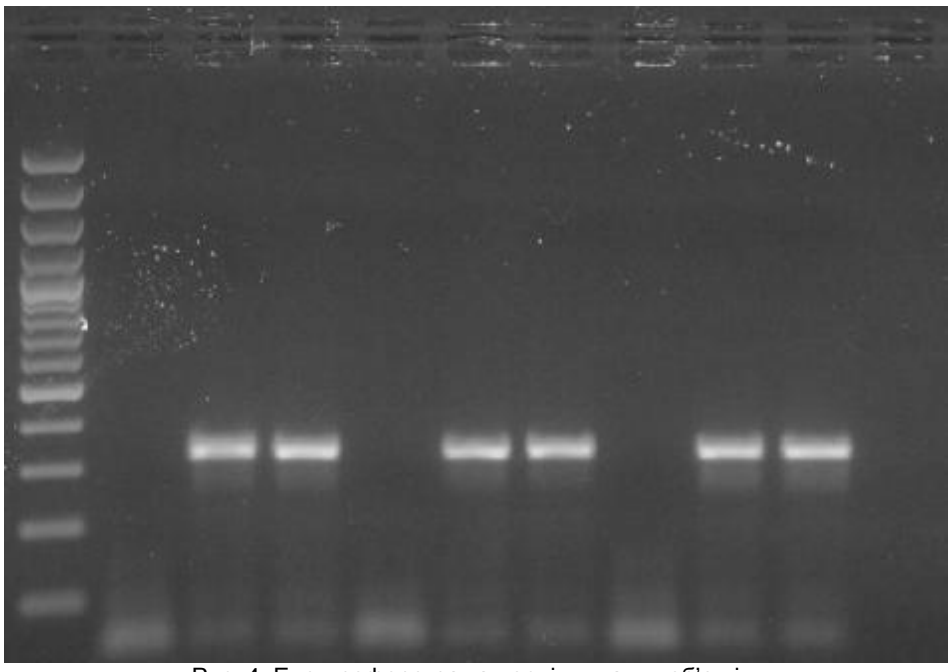

Рис. 4. Електрофореграма досліджуваних об'єктів.

Висновки та перспективи подальших досліджень. 1. Розроблена нами тест-система пропонується для впровадження до застосування у ветеринарній практиці на регіональному рівні (обласні та районні ветеринарні лабораторії) та загальнодержавному рівнях (Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи) оскільки є високоспецифчною.

2. Тест – система є безпечною в використанні, проявляє високу специфічність, що переважає над тест-системами, що нині використовуються.

3. Чутливість тест-системи складає становить 10^{-11} g DNA.

Список використаної літератури:

1. Skirrow M.B. 1994. Diseases due to Campylobacter, Helicobacter and related bacteria. J. Comp. Pathol. 111:113–149.
2. Nam H.M., Srinivasan V., Murinda S.E. et al. // Foodborne Pathog. Dis. – 2005. – Vol. 2, N 2. – P. 160-168.
3. Кампілобактеріоз птиці / А.В. Березовський , Т.І. Фотіна , О.І. Касяненко, Ю. Є.Дворська, Суми 2010. 140 с.
4. Borck B., Stryhn H., Ersboll A.K. et al. // J. Appl. Microbiol. – 2002. – Vol. 92. – P. 574–582.
5. Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. // Int. J. Food Microbiol. – 2007. – Vol. 117. – P. 237–257.

Дерябин О. Н., Пустовит Н. А., Пинчук Н. Г. Испытание специфичности ПЦР тест-системы "Campylobacter SPP. ПЦР-ТЕСТ" для обнаружения и идентификации ДНК бактерий да Campylobacter.

Совершенствование методов анализа пищевых продуктов на наличие в них возбудителей острых кишечных инфекций (ОКИ), в том числе бактерий рода Campylobacter spp. – одна из наиболее актуальных задач гигиены питания. Эта задача диктуется необходимостью включения микробиологических исследований в систему профилактики ОКИ, а также проведение мониторинга патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Проведение исследования материалов на наличие кампилобактеров микробиологическим методом требует значительных затрат времени, ресурсов, обладания и наличия определенных навыков рабочего персонала. Эффективным современным методом быстрой диагностики кампилобактериоза является полимеразная цепная реакция. С помощью этого метода можно не только осуществлять быструю идентификацию возбудителей в случае острых форм заболевания, но и обеспечить выявление их в продуктах животного происхождения и у животных, являются естественными резервуарами возбудителя. В данной статье изложены результаты испытаний специфичности ПЦР тест-системы "Campylobacter spp. ПЦР-ТЕСТ" для выявления и идентификации ДНК бактерий рода Campylobacter в объектах окружающей среды и клинических материалах на базе отдела молекулярной биологии и иммунохимии Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов.

Ключевые слова: *кампилобактериоз, тест-система, полимеразная цепная реакция, материал, объекты окружающей среды, испытания.*

Deryabin O. N., Pustovit N. A., Pinchuk N. G. Test specificity of the PCR test system "Campylobacter spp.-PCR test" for the detection and identification of bacteria of the genus Campylobacter DNA.

Improved methods for the analysis of food products for the presence of pathogens of acute intestinal infections (AII), including bacteria of the genus Campylobacter spp. – one of the most pressing problems of food hygiene. This task is dictated by the need to include microbiological research in the prevention of acute intestinal infections, as well as the monitoring of pathogens in food. Study materials for the presence of Campylobacter microbiological method requires a significant investment of time, resources, and possession of certain skills workers. Effective modern methods of rapid diagnosis of campylobacteriosis is a polymerase chain reaction. With this method, you can not only carry out rapid identification of pathogens in acute forms of the disease, but also to ensure the identification of animal products and animals, are the natural reservoir of the parasite. This article presents the results of testing the specificity of PCR test system "Campylobacter spp. PCR test" to detect and identify the DNA of bacteria of the genus Campylobacter in the environment and clinical materials on the basis of the department of molecular biology and immunochemistry State scientific control institute of biotechnology and strains of microorganisms .

Keywords: *campylobacteriosis, system test, polymerase chain reaction, the material objects of the environment, testing.*

Рецензент: д.вет.н., професор Березовский А. В.
Дата надходження до редакції: 02.12.2015 р.

УДК 619:616.98:579 (043:3)

ВИВЧЕННЯ СТАНУ ІНФІКОВАНОСТІ ПАТОГЕННИМИ МІКОБАКТЕРІЯМИ ТВАРИН ЗООЛОГІЧНИХ КОЛЕКЦІЙ

Н. В. Алексєєва, к.вет.н., доцент
О. І. Сосницький, д.вет.н., професор
О. О. Шулешко, к.вет.н., доцент
Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет

У статті наведені результати щодо вивчення стану інфікованості патогенними мікобактеріями тварин зоологічної колекції зоозони комунального закладу «Парк культури і відпочинку ім. Т.Г. Шевченка», міста Дніпропетровськ. Моніторинг благополуччя зоопаркових тварин на туберкульоз проводили шляхом застосування інтрадермальної туберкулінової проби та бактеріологічного дослідження матеріалу з об'єктів зовнішнього середовища (вольєрів і кліток) та проб фекалій.

Ключові слова: *мікобактеріальні інфекції, зоопаркові тварини, епізоотологічне благополуччя, інтрадермальний тест, дослідження об'єктів зовнішнього середовища, стан інфікованості.*

Постановка проблеми у загальному вигляді. Серед інфекційних хвороб тварини і людини особливе місце належить туберкульозу, збудником якого є мікроорганізми, що відносяться до класу Actinobacteria, ряду Corynebacteriales, родини Mycobacteriaceae, роду Mycobacterium та являються аеробними, не утворюючими спор, нерухливими кислотостійкими паличками. За класифікацією Bergeys of Systematic Bacteriology (2012), рід Mycobacterium нараховує 129 видів і підвидів та представлений облігатними паразитами, сапрофітами й умовно-патогенними формами. Філогенетичне положення родини Mycobacteriaceae визначено за допомогою аналізу послідовностей гену 16S rRNA.

Туберкульоз завдає значних економічних збитків тваринництву і становить реальну небезпеку у зараженні людей. Проти туберкульозу немає достатньо ефективних засобів специфічної профілактики та лікування. Тому основою профілактичних та оздоровчих заходів при туберкульозі тварин є своєчасна і точна діагностика, тобто виявлення та забій інфікованих тварин. Основним методом прижиттєвої діагностики туберкульозу тварин є внутрішньошкірна проба з ППД-туберкуліном. Однак, вона володіє певними недоліками: виявлення неспецифічних реакцій на туберкулін у здорових тварин і недовиявлення інфікованих туберкульозом тварин у неблагополучних стадах. Лабораторні методи діагностики туберкульозу тварин також є недостатньо ефективними, довготривалими, трудомісткими і не дозволяють у короткий термін встановити точний діагноз.

Особливо необхідно виділити проблему діагностики туберкульозу тварин зоологічних колекцій, які є однією з найважливіших складових системи збереження, відновлення рідкісних і зникаючих видів диких тварин. Зоологічні колекції тварин (зоопарки, натуралістичні центри дітей та