

**Conclusions and recommendations for further research.** It was found that clinical manifestation of porcine eperythrozoonosis in swine is exacerbated by bacterial and viral microflora. The data will be used for the development of the mixed viral-bacterial infections prevention.

**Keywords:** eperythrozoonosis, associated course, mycoplasmosis, immunodeficiency, pathogen identification, clinical signs.

#### REFERENCES

1. Hoelzle, L.E. (2007). Significance of haemotrophic mycoplasmas in veterinary medicine with particular regard to the *Mycoplasma suis* infection in swine. *Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr*, 120, 34-41.
2. Hoelzle, L.E. (2008). Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis*. *Vet. Microbiol.*, 130, 215-226.
3. Portiansky, E.L., Quiroga, M.A., Machuca, M.A., & Carlos, P.J. (2004). *Mycoplasma suis* in naturally infected pigs: an ultrastructural and morphometric study. *Pesq. Vet. Bras.*, 24(1), 1-5.
4. Peysak, Z. (2008). *Bolezni sviney [Disease of pigs]*. Brest, Brest Printing House [in Russian].
5. Zhongolovich, A.E. (2008). Etio-epizooticheskie osobennosti micoplasmosa sviney I usoverchenstvovanie metodov ego diagnostiki i lechenie [Etio-epizootologic features of pigs mycoplasmosis and improvement of its diagnosis and treatment methods]. *Extended abstract of candidate's thesis*. Omsk [in Russian].
6. Elikor, S., Grimm, J., & Haynritsi, K. (2010). *Novoe v diagnostike eperitrozoonoza sviney [New in the diagnosis of swine eperitrozoonoza]*. PERFECT AGRICULTURE. Retrieved from [http://www.perfectagro.ru/pdf/svin\\_vo/svin\\_vo\\_4.html](http://www.perfectagro.ru/pdf/svin_vo/svin_vo_4.html) [in Russian].

УДК 636.09:303.64:579.84

ПУСТОВІТ Н.А.\*, e-mail: nadiapustovit@gmail.com

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

### РОЗРОБКА ТА УДОСКОНАЛЕННЯ ЗАСОБУ ІНДИКАЦІЇ КАМПІЛОБАКТЕРІЙ

Удосконалення методів дослідження та 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. Ефективним сучасним методом швидкої діагностики кампілобактеріозу є полімеразна ланцюгова реакція. За допомогою цього методу можливо не лише здійснювати швидку ідентифікацію збудників, але й забезпечити виявлення їх у продуктах тваринного походження. В даній статті викладені результати випробувань безпечності у використанні, висока специфічність та чутливості ПЛР тест-системи «*Campylobacter spp.*-ПЛР-ТЕСТ» для виявлення та ідентифікації ДНК бактерій роду *Campylobacter* в об'єктах навколишнього середовища та клінічних матеріалах.

**Ключові слова:** кампілобактеріоз, тест-система, полімеразна ланцюгова реакція, матеріал, об'єкти навколишнього середовища.

\* Аспірант, наук. керівник – канд. вет. наук, ст.наук.сп. Н.Г. Пінчук

**Вступ.** Кампілобактеріоз (*Campylobacteriosis*) – інфекційне антропоозоозне захворювання, яке характеризується гострим перебігом, загальною інтоксикацією організму 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. Серед усіх кампілобактерій найбільшого значення у розвитку захворювання у людей є *Campylobacter jejuni*, *C. lari*, *C. coli*.

У промислово розвинених країнах *C. jejuni* є 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 спостерігається помірно, але достатньо інтенсивне зниження захворюваності [1].

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 до системи профілактики ГКІ, а також проведення моніторингу патогенних мікроорганізмів у харчових продуктах, який повинен базуватися на використанні високоспецифічних кількісних методів [2]. Особливо це потрібно для контролю ефективності протиепідемічних заходів на підприємствах, які працюють із сирими продуктами, для зниження перехресної забрудненості, що особливо важливо в разі виявлення кампілобактерій в харчових продуктах [3].

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

Сучасні методи молекулярно-генетичного аналізу, на основі виявлення специфічних для мікроорганізмів нуклеотидних послідовностей ДНК, значно розширюють можливості виявлення у харчових продуктах важко культивованих патогенних мікроорганізмів [4].

Оскільки *Campylobacter spp.* дуже чутливий до умов культивування (наявність CO<sub>2</sub> і кисню, наявність крові та селективних домішок), культуральні методи їх аналізу досить трудомісткі і багатоетапні та завжди є ризик втрати кампілобактерію у разі порушення умов інкубації або присутності великої кількості сторонньої мікрофлори [5].

**Мета нашої роботи** – випробування специфічності розробленої ПЛР тест-системи «*Campylobacter spp.*-ПЛР-ТЕСТ» для виявлення та ідентифікації ДНК бактерій роду *Campylobacter* у біологічному матеріалі та об'єктах навколишнього середовища.

**Матеріали і методи досліджень.** Матеріалом досліджень був розроблений діагностичний набір на основі полімеразної ланцюгової реакції для швидкого виявлення ДНК мікроорганізмів роду *Campylobacter spp.*,

(ампліфікація консервативної ділянки гену (16S рРНК) в біологічному матеріалі. Дослідження проводилось паралельно на двох тест-системах: «*Campylobacter spp.*-ПЛР-ТЕСТ» (Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів) та АмплиСенс® *Campylobacter spp.-EPh* (Москва, Центральний науково-дослідний інститут епідеміології МОЗ РФ).

Пошук та аналіз 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).

ПЛР проводили на чотирьохканальному ампліфікаторі «Герцик» 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 обраний метод лізису клітин гуанідинтіоціанатом з наступною сорбцією дезоксирибонуклеїнової кислоти на сорбенті.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Основою для розробки нових методів діагностики кампілобактеріозу стали результати власних досліджень та аналіз даних літератури, такі що переконливо свідчать про перспективність використання методу на основі ПЛР для визначення наявності збудника *Campylobacter spp.* з метою моніторингу хвороби у патологічному матеріалі, об'єктах зовнішнього середовища та продуктах харчування.

Розроблена тест-система, призначена для виявлення та ідентифікації ДНК бактерій *Campylobacter* методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) «*Campylobacter spp.*-ПЛР-ТЕСТ». В основі методу лежать виділення з досліджуваного зразка бактеріальної ДНК; проведення ампліфікації специфічної ділянки ДНК *Campylobacter spp.* при використанні специфічних олігонуклеотидних праймерів і синтезу комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ферменту Таq-полімерази.

Для виконання ПЛР були використані два синтетичних олігонуклеотидних праймера, підбрані таким чином, що вони є комплементарними двом ланцюгам специфічного фрагменту ДНК кампілобактерій різних видів. Правильний вибір олігонуклеотидних праймерів визначає ефективність та відтворюваність ПЛР.

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

Детекція продуктів ПЛР здійснюється методом електрофорезу в агарозному гелі при довжині ампліфікованого специфічного фрагменту ДНК *Campylobacter spp.* – 319 п.н. (табл. 1).

Температурні режими проведення ПЛР

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°C – 4 хвилини	1 цикл – за температури 95°C – 4 хвилини
2 цикл – за температури 95°C – 1 хвилина за температури 60°C – 1 хвилина за температури 72°C – 2 хвилини	2 цикл – за температури 95°C – 30 секунд за температури 60°C – 30 секунд за температури 72°C – 30 секунд
Цикл 2 повторюють 35 разів	Цикл 2 повторюють 35 разів
3 цикл – за температури 72°C – 7 хвилини	3 цикл – за температури 72°C – 4 хвилини
4 цикл – за температури 10°C – збереження	4 цикл – за температури 10°C – зберігання

З метою перевірки таксономічної специфічності тест-системи були використані штами бактерій *Salmonella*, *Esherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, які представленою тест-системою не виявляються (рис. 1).

На рисунку 1 встановлено світіння позитивного зразку *Campylobacter spp.* (*Campylobacter jejuni*), із довжиною фрагменту 319 п.н. Інші зразки не дають світіння на даній висоті і тому вважаються негативними.

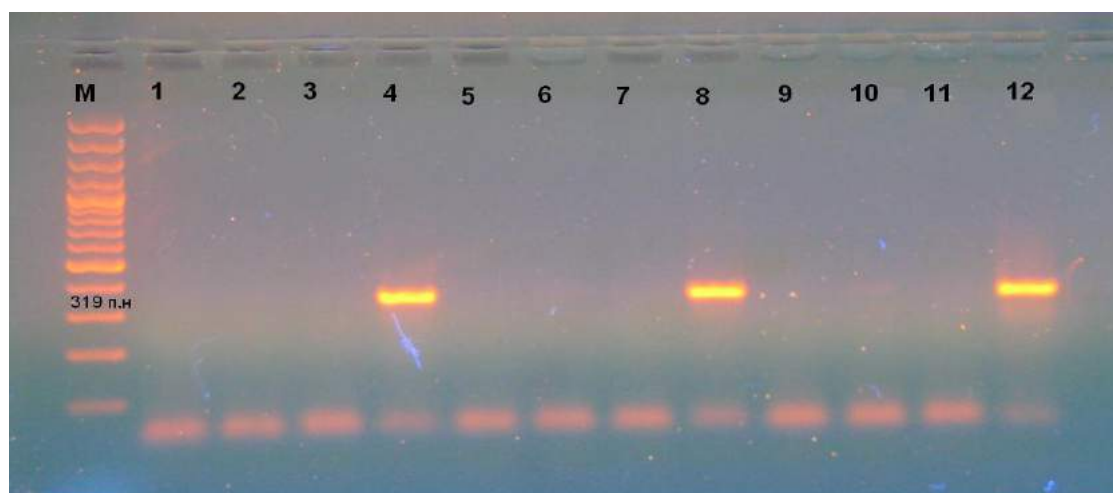
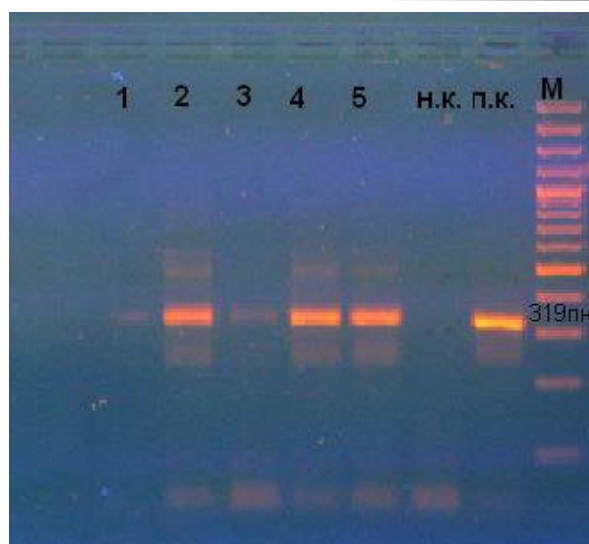


Рис. 1. Визначення специфічності розробленої тест-системи:

М – маркер розміру ДНК («100 bp Plus DNA Ladder»; 1, 5, 9 – *Salmonella sp.*;  
2, 6, 10 – *Esherichia coli*; 3, 7, 11 – *Staphylococcus aureus*;  
4, 8, 12 – *Campylobacter jejuni*.

Чутливість тест-системи визначалась за різних розведень 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-системи для детекції *Campylobacter jejuni* становить  $10^{-11}$  g DNA.

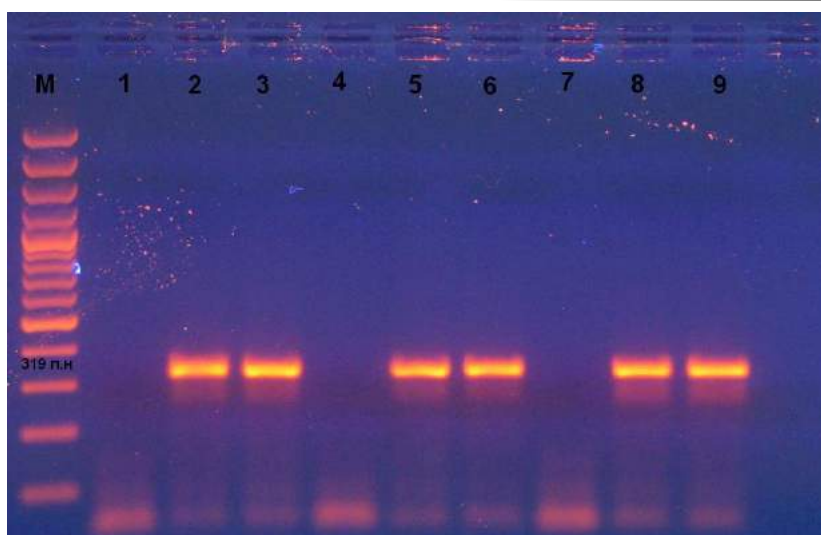
Проведено дослідження специфічності розробленої тест-системи. Для цього були відібрані проби (підстилка, вода, силос, комбікорм, товстий і тонкий кишківник) для виявлення збудника кампілобактеріозу *Campylobacter spp.* (рис. 2).



**Рис. 2. Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ПЛР з праймерами 16SF1\1S-R2 при дослідженні проб на наявність мікроорганізмів роду *Campylobacter spp.*: М – маркер розміру ДНК (100 bp Plus DNA Ladder); 1 – підстилка; 2 – силос; 3 – комбікорм; 4, 5 – товстий і тонкий кишківник.**

Позитивна реакція досліджуваних проб, довжина фрагменту відповідає 319 п.н., що свідчить про наявність *Campylobacter spp.* Дослідження проводилось паралельно на двох тест-системах: «*Campylobacter spp.*-ПЛР-ТЕСТ» (Державного науково -контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів) та АмплиСенс® *Campylobacter spp.-EPH* (Москва, Центральний науково-дослідний інститут епідеміології МОЗ РФ). Суттєвих розбіжностей у результатах цих двох тест-систем під час дослідження не виявлено, проте за допомогою розробленої тест-системи «*Campylobacter spp.*-ПЛР-ТЕСТ» можна виявити все ж збудник у навколишньому середовищі, продуктах харчування та від тварин носіїв збудника. Перевагою тест-системи є висока специфічність та чутливість (рис. 3).

Отже можна сказати, що на сьогодні важливим завданням ветеринарної медицини стосовно кампілобактеріозу, є забезпечення епізоотичного благополуччя серед поголів'я свійських тварин, особливо птиці, проведення якісної діагностики та постійне визначення наявності кампілобактерій в продуктах харчування тваринного походження. Дослідження розробленої діагностичної системи показали, що вона відповідає всім вимогам для якісного проведення дослідів. Отримані результати надали можливість створити та пропонувати для впровадження тест-систему «*Campylobacter spp.*-ПЛР-ТЕСТ» для виявлення та ідентифікації ДНК бактерій роду *Campylobacter*.



**Рис. 3. Електрофореграма досліджуваних об'єктів:**  
**М – маркер розміру ДНК (100 bp Plus DNA Ladder); 1, 4, 7 – негативні**  
**контролі; 2, 5, 8 – АмплиСенс® *Campylobacter spp.-EPh*; 3, 6, 9 –**  
**«*Campylobacter spp.* -ПЛР-ТЕСТ».**

**Висновки та перспективи подальших досліджень:**

1. Тест-система є безпечною у використанні, володіє високою специфічністю та чутливістю, у порівнянні з тест-системами, які використовуються у теперішній час.

2. Чутливість тест-системи становить  $10^{-11}$  g DNA.

3. Розроблена тест-система «*Campylobacter spp.*-ПЛР-ТЕСТ» 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).

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Кампілобактеріоз птиці / А.В. Березовський, Т.І. Фотіна, О.І. Касяненко, Ю. Є. Дворська. – Суми : СНАУ, 2010. – 140 с.
2. Skirrow M.B. Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria / M. B. Skirrow // *Jornal of Comparative Patology*. – 1994. – Vol. 111. – P. 113–149.
3. Detection of *Campylobacter jejuni* in dairy farm environmental samples using SYBR green real-time polymerase chain reaction / H.M. Nam, V.A. Srinivasan, S.E. Murinda, S.P. Oliver // *Foodborne Pathogens and Disease*. – 2005. – Vol. 2, № 2. – P. 160–168.
4. Humphrey T. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective/ T. Humphrey, S. O'Brien, M. Madsen // *Int. Journal Food Microbiology*. – 2007. – Vol. 117. – P. 237–257.
5. Termophilic *Campylobacter spp.* in turkey samples: evaluation of two automated enzyme immunoassays and conventional microbiological techniques / B. Borck, H. Stryhn, A.K. Ersboll, K. Pedersen // *Journal of Applied Microbiology*. – 2002. – Vol. 92. – P. 574–582.

**РАЗРАБОТКА И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБА ИНДИКАЦИИ КАМПИЛОБАКТЕРИЙ / Пустовит Н.А.**

*Усовершенствование 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. Эффективным современным методом быстрой диагностики кампилобактериоза является полимеразная цепная реакция. С помощью этого метода можно не только осуществлять быструю идентификацию возбудителей, но и обеспечить выявление их в продуктах животного происхождения. В данной статье изложены результаты испытаний безопасности в использовании, высокая специфичности и чувствительности ПЦР тест-системы «*Campylobacter spp.* ПЦР-ТЕСТ" для выявления и идентификации ДНК бактерий рода *Campylobacter* в объектах окружающей среды и клинических материалах.

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

## DEVELOPMENT AND IMPROVEMENT OF CAMPYLOBACTERIA IDENTIFICATION TECHNIQUE / Pustovit N.A.

**Introductions.** Polymerase chain reaction is an effective modern method of rapid diagnosis of campylobacteriosis. Using this method, it is possible not only carry out rapid identification of pathogens in acute forms of the disease, but also ensure the identification of excite in products and animals.

**The goal of the work was to improve methods for the analysis of food products for the presence of pathogens of acute intestinal infections (AII), including bacteria of the genus *Campylobacter spp.* which is 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 of workers.**

**Materials and methods.** The diagnostic kit based on PCR for rapid detection of microbial DNA genus *Campylobacter spp.*, (conservative areas amplification gene (16S rRNC) in biological materials was used.

**Results of research and discussion.** The developed primers 16S-F1 and 16S-R2 were designed according to all requirements, have a high theoretical specificity to bind to the DNA matrix, and don't have critical homology with other bacteria and viruses. The nucleotide sequence search was conducted using databases GeneBank, EMBL (European Molecular Biology Library), DDBJ (Japanese database of nucleotide sequences), and Entrez (National Center of Biotechnological information, USA). The PCR was performed using a four-channel thermocycler «Tertsik» (NVF «DNK-Tehnologija», Moscow, Russia).

The developed PCR-based test kit is aimed at the rapid detection of DNA of the *Campylobacter spp.* microorganisms in biological materials by means of specific amplification of the conserved locus of 16S RNA gene.

PCR system for *Campylobacter* diagnoses showed that all the requirements for the quality of the experiment. The results made it possible to create and provide for the implementation of test system «*Campylobacter spp.*-PCR-test" for detection and identification of the pathogens of the *Campylobacter* genus.

### **Conclusions and perspectives for further research:**

1. The test-system is safe, have high specificity, compared to the test systems that are used nowadays.

2. Sensitivity of the developed test system is 10—11 g DNA.

3. Developed test system «*Campylobacter spp.* PCR-TEST" is proposed for implementation for use in veterinary practice at regional (regional and district veterinary laboratories) and national levels (State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary Expertise) is.

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

## REFERENCES

1. Berezovs'kyj, A.V., Fotina, T.I., Kasjanenko, O.I., & Dvors'ka, Ju.Je. (2010). *Kampilobakterioz ptyci [Campylobacteriosis among birds]*. Sumy [in Ukraine].
2. Skirrow, M.B. (1994). Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *Journal of Comparative Pathology*, 111, 113-149.
3. Nam, H.M., Srinivasan, V.A., Murinda S.E., & Oliver, S.P. (2005). Detection of *Campylobacter jejuni* in dairy farm environmental samples using SYBR green real-time polymerase chain reaction. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2, 160-168.
4. Humphrey, T., O'Brien, S. & Madsen, M. (2007). *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. Journal Food Microbiology*. 117, 237-257.
5. Borck, B., Stryhn, H., Ersboll, A. & Pedersen, K. (2002). Thermophilic *Campylobacter* spp. in turkey samples: evaluation of two automated enzyme immunoassays and conventional microbiological techniques. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 574-582.

УДК 619:616.9-036

**РАДЗИХОВСЬКИЙ М.Л.**, канд. вет. наук, доц., e-mail: nickvet@mail.ru,  
**ДИШКАНТ О.В.**, канд. вет. наук, e-mail: nickvet@mail.ru  
*Житомирський національний агроекологічний університет*  
**РОЗУМНЮК А.В.**, канд. вет. наук, доцент, e-mail: aroz@mail.ru  
*Інститут ветеринарної медицини НААН*

## МОРФОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ СОБАК, УРАЖЕНИХ ПАРВОВІРУСНИМ ЕНТЕРИТОМ

У статті наведені морфологічні та біохімічні показники крові породистих та безпородних собак інфікованих парвовірусним ентеритом. Дослідження проводились у ветеринарних клініках міста Житомир, упродовж останніх трьох років на 288 собак інфікованих вірусом родини *Parvoviridae*. У хворих на парвовірусний ентерит тварин встановлено еритроцитопенію, лейкоцитопенію, лімфоцитопенію, гіпопротеїнемію, підвищення активності АсАТ, лужної фосфатази та збільшення ШОЕ.

**Ключові слова:** парвовірусний ентерит собак, стабілізована кров, сироватка крові, морфологічні показники, біохімічні показники.

**Вступ.** Інфекційний ентерит – запалення тонкого кишечника, викликане бактеріями або вірусами. Віруси є причиною хвороби в 70% випадків, що проявляється гострим перебігом. Ентерит, викликаний вірусом, рідко протікає тільки з ураженням тонкого кишечника. Найчастіше це захворювання проявляється у формі гастроентериту (із залученням шлунка) або ентероколіту (з ураженням товстого кишечника) [1, 2].

Парвовірусний ентерит собак – гостра контагіозна хвороба, що характеризується ураженням шлунково-кишкового тракту й серцевого м'язу. Вперше була зареєстрована у 1976 році в Бельгії, хоча деякі автори констатують перше виникнення у 1978 році в Північній Америці. У кінці 1979 року ветеринарні лікарі СРСР (м. Москва) реєстрували окремі випадки захворювання собак з ознаками блювання, тяжким перебігом ентериту і, як