

S. aureus was isolated in association with and *K. pneumonia* and *S. pyogenes*. Less commonly encountered association *E. coli*, *P. vulgaris* and *S. pyogenes*. The average discharge frequency was characteristic of *P. aeruginosa* – 8,11 %.

Among the studied cultures of *S. aureus* resistant to amoxicillin, gentamicin, kanamycin, chloramphenicol and streptomycin were 16 %, to penicillin – 36 %. ceftioklyn was high active cultures relative to *S. agalactiae*, *E. coli*, *K. pneumonia* and *S. pyogenes*. Cultures *S. pyogenes* resistant to amoxicillin, kanamycin, doxycyclin, enrofloxacin, oxacillin, streptomycin, tetracycline and ceftioklyn not. All color culture *P. vulgaris* had high sensitivity to amoxicillin, doxycyclin, chloramphenicol, tetracycline and ceftioklyn. Kanamycin, lincomycin and ceftioklyn showed the same high amoxicillin relative to *E. coli*.

Thus, in the occurrence and development of respiratory disease in calves, including pneumonia, involving *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *P. vulgaris*, *K. pneumonia* and *E. coli*. Among the isolated cultures occupy an important place culture *S. aureus* to 29.85 % and *K. pneumonia* to 23.57 % of the samples, which often stand in association with *S. pyogenes*. The highest activity in vitro towards isolated from calves with respiratory disease manifests drug crops ceftioklyn.

Keywords: calves, bronchopulmonary pathology microorganisms antibiotic resistance

УДК 619:616.98:579.835.12:504.4/.5:631.22

ДОСЛІДЖЕННЯ КАМПІЛОБАКТЕРІЙ В ОБ'ЄКТАХ ДОВКІЛЛЯ

Якубчак О.М., Лапа О.Ю.

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
м. Київ, Україна, e-mail: olga.yakubchak@gmail.com

У статті наведено дані щодо бактерій роду *Campylobacter* як збудників інфекцій, які перебігають з ознаками токсикоінфекцій у людей. Висвітлено дослідження кампілобактерій в об'єктах довкілля ферми: у воді з напувалки, різних видах корму та підстилки.

Ключові слова: кампілобактерії, велика рогата худоба, молочно-товарна ферма, корм, вода, підстилка, полімеразна ланцюгова реакція.

З кожним роком в Україні та світі реєструється збільшення ризиків виникнення харчових токсикоінфекцій у людей під час вживання контамінованих продуктів харчування та води. Останнім часом істотне значення в етіології гострих кишкових інфекцій набувають «нетрадиційні» бактерії. Серед цих мікроорганізмів найбільше значення має рід *Campylobacter*, на частку яких припадає до 10–15 % випадків спорадичних діарейних захворювань, а також значна кількість водних, харчових, зокрема молочних спалахів, описаних в іноземній літературі. Питанням кампілобактеріозної інфекції значну увагу приділяє Всесвітня організація охорони здоров'я. За її ініціативою вивчення даної інфекції включено до національних програм профілактики діарейних хвороб.

Основним природним резервуаром кампілобактерій є кури, індикі, дикі птахи, гризуни, а також велика рогата худоба, вівці, кози, свині.

У великої рогатої худоби кампілобактерії локалізуються, в основному, у кишечнику і виділяються з фекаліями, інфікуючи навколишнє середовище, а під час забою та первинної переробки – продукти забою [7]. Згідно даних G. Douglas Inglis [6] близько 25 % тварин можуть бути прихованими бактеріоносіями. *Campylobacter fetus subsp. fetus* у великої рогатої худоби вважається облігатною мікрофлорою травного каналу, але може бути й причиною спорадичних абортів [12]. Бактеріоносійство *Campylobacter jejuni* і *Campylobacter coli*, в середньому, складає 14,7 % і 6,9 %, відповідно [10]. У деяких країнах рівень інфікування великої рогатої худоби даним збудником сягає 29 % [11].

Передається дана інфекція через забруднені кампілобактеріями годівниці, напувалки, інвентар, підстилку, інфіковані корми, особливо тваринного походження, воду. Важливою ланкою в епізоотичному ланцюзі є інфіковані мухи, таргани, гризуни, синантропна та дика птиця тощо.

Кампілобактерії (*Campylobacter species*) – грамнегативні бактерії у вигляді спіралі чи римської V, котрі є причиною інфекції, що перебігає з ознаками токсикоінфекції у людей. За даними на 2013 р. рід *Campylobacter* об'єднує 17 видів і 6 підвидів бактерій. При цьому для сільськогосподарських тварин і людей найбільше етіологічне значення мають види *C. jejuni* та *C. coli* [1]. У 80 % випадків причиною кампілобактеріозної інфекції вважається *Campylobacter jejuni*, а в 18,6 % – *Campylobacter coli*.

Виявлення ДНК *Campylobacter species* у дослідному матеріалі за відсутності клінічних проявів інфікування свідчить про бактеріоносійство, що у разі порушень під час первинної переробки тварин та обігу продуктів забою може сприяти підвищенню кількості вказаних мікроорганізмів (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* [8]) і ризику виникнення інфекцій, що перебігають з ознаками токсикоінфекції у споживачів.

Складність культивування кампілобактерій та висока вартість бактеріологічних досліджень призводить до недооцінювання значення кампілобактерій в етіології гострих кишкових інфекцій, що перебігають з ознаками токсикоінфекцій у людей, що сприяє спотворенню реальної картини поширення даної інфекції. В Україні реєстрація інфікування кампілобактеріями залишається на низькому рівні, і захворюваність складає менше одного випадку на 100 тисяч населення в рік [5], тоді як цільовий моніторинг

кампілобактерій у структурі гострих кишкових інфекцій, що перебігають з ознаками токсикоінфекцій у людей у Західних країнах дозволяє виявляти від 50 до 100 випадків кампілобактеріозного інфікування на 100 тисяч населення [9].

Сучасні методи діагностики, такі як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), можуть прискорити та зменшити витрати на постановку діагнозу за інфікування кампілобактеріями людей і тварин, а також під час контролю безпечності продуктів харчування. Метод ПЛР є експрес-методом, який дозволяє виконувати аналіз впродовж 4–8 годин, має високу чутливість, специфічність, забезпечує можливість роботи з будь-яким видом біологічного матеріалу, пробами з об'єктів довкілля, включаючи харчові продукти [2, 3].

Мета досліджень – провести дослідження щодо виявлення бактерій роду *Campylobacter* у об'єктах довкілля (вода, корм та підстилка) молочно-товарної ферми методом полімеразної ланцюгової реакції.

Матеріали та методи. Матеріалами досліджень слугували: вода з напувалки, суміш силосу та сінажу з годівниці та зі складу, підстилка на фермі.

Дослідження проводилися в акредитованій лабораторії відділу молекулярної біології та імунохімії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ).

Пробопідготовку для виділення ДНК *Campylobacter* з дослідних проб проводили згідно «Методичних рекомендацій з відбору, транспортування, зберігання та пробопідготовки біологічного матеріалу для ПЛР-діагностики» [4]. Виділення ДНК із дослідного матеріалу проводили за допомогою Амплі Сенс ПЛР-тест-системи «ДНК-сорб-В-50». Детекцію продуктів ПЛР-ампліфікації визначали електрофоретичним розділенням ампліфікаційної суміші в зафарбованому бромистим етидієм агарозному гелі.

Результати досліджень. Нині кампілобактеріозне інфікування серед людей і тварин зареєстровано у багатьох країнах світу на всіх континентах. У деяких регіонах розвинених країн цю інфекцію реєструють частіше, ніж сальмонельоз і шигельоз. Щодо України, то інфекції, що перебігають з ознаками токсикоінфекцій, збудниками яких є кампілобактерії, мало вивчені і майже не досліджуються або відносяться до інфекцій невизначеної етіології.

Рівень поширення бактерій роду *Campylobacter* у об'єктах довкілля, що досліджувалися, в Україні зазвичай визначається на підставі результатів скринінгових досліджень, що використовуються лише для виявлення наявної інфекції. Натомість за кордоном у разі отримання позитивного результату під час дослідження скринінговим методом обов'язково проводиться підтвердження отриманих результатів арбітражним методом для ідентифікації збудників.

Нами після пробопідготовки та виділення чистої ДНК дослідні проби були піддані електрофорезу, щоб виявити наявність кампілобактерій. При цьому бромистий етидид зв'язався з фрагментами двохланцюгової ДНК, які проявилися в гелі у вигляді світлих смуг за УФ-випромінення ($\lambda=290\text{--}330\text{ нм}$). Для візуалізації таких смуг використовували спеціальний прилад – транслюмінатор, а отримані результати документували фотографуванням (рисунок 1). В якості позитивного контролю використовували шкалу ДНК, яка містила фрагменти ДНК кампілобактерій різної довжини (стовпчик праворуч) для оцінки розміру продуктів реакції ПЛР.



Рис. 1. Результати електрофорезу продуктів полімеразної ланцюгової реакції: (1) вода з напувалки; (2) суміш силосу та сінажу зі складу; (3) суміш силосу та сінажу з годівниці; (4) підстилка; (5) контроль)

Наші дослідження показали (рис. 1), що вода, суміш силосу та сінажу з годівниці та підстилка позитивно прореагували щодо наявності в них бактерій роду *Campylobacter*. Фрагменти ДНК розділилися за молекулярною масою в агарозному гелі. Специфічність смуг ампліфікованої ДНК підтвердилася їхнім розміщенням відносно маркерів молекулярної маси і розміщення фрагмента позитивного контролю ампліфікації.

Отже, об'єкти довкілля ферми обсеменені бактеріями роду *Campylobacter*. Недотримання належних санітарно-гігієнічних вимог щодо забою та первинної переробки тварин може сприяти контамінації продуктів забою кампілобактеріями.

Висновок. Дослідженнями встановлено, що бактерії роду *Campylobacter* наявні в об'єктах довкілля ферми, таких як: вода, суміш силосу та сінажу з годівниці, підстилка, які в подальшому можуть потрапляти до організму тварин.

Перспективи подальших досліджень. Результати даної роботи спонукають нас проводити наступні дослідження щодо кількості та виду бактерій *Campylobacter* в об'єктах довкілля (вода, корм, підстилка), а в подальшому стосовно виявлення кампілобактерій у сирій яловичині після забою великої рогатої худоби.

Список літератури

1. Бабкін А.Ф. Вивчення біологічних властивостей польових ізолятів і музейних штамів кампілобактерій / Бабкін А.Ф., Обуховська О.В., Куценко В.А., Калініченко Т.В // Ветеринарна медицина: між від. темат. наук. зб. – Х., 2013. – Вип. 97. – С. 57–60.
2. Ветеринарна санітарна мікробіологія: навч. посіб. / А.М. Головка, І.О. Рубленко. – К.: Аграрна наука, 2010. – 284 с.
3. Возможность применения ПЦР в ветеринарии [Электронный ресурс]. – Птицеводство. – 2009. <http://webpticeprom.ru/ru/articles-veterinary.html?pageID=1260097527>
4. «Методические рекомендации по взятию, транспортировке, хранению и пробоподготовке биологического материала для ПЦР-диагностики». – ЦНИИЭ МЗ РФ, 2003. – 21 с.
5. Сирина Е.А., Усачева Е.В., Пахольчук Т.М., Пахольчук О.П., Гинзбург Р.М., Родко А.С., Матвеева Т.Б. Современные клиникотерапевтические аспекты кампилобактериоза у детей // Современная педиатрия. – 2011. – № 2. – С. 68–70.
6. Inglis G. D., Kalischuk L. D. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – Vol. 69. – P.3435–3447.
7. Garcia M. M., Lior H., Stewart R. B., Ruckerbauer G. M., Trudel J. R.R., Skljarevski A. Isolation, characterization, and serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from slaughter cattle // Applied and Environmental Microbiology. – 1985. – Vol. 49. – P. 667–672.
8. <http://www.analizmarket.ru/tests/id/4302/>
9. Kuhn K.G., Falkenhorst G., Ceper T., Dalby T., Ethelberg S., Molbak K., Krogfelt K.A. Detection of antibodies to *Campylobacter* in humans using enzyme-linked immunosorbent assays: a review of the literature // Diagn Microbiol Infect Dis. – 2012. – Vol. 74. – P. 113–118.
10. Rotariu O., Dallas J.F., Ogden I.D., MacRae M., Sheppard S.K., Maiden M.C., Gormley F.J., Forbes K.J., Strachan N.J. Spatio temporal homogeneity of *Campylobacter* subtypes from cattle and sheep across north eastern and south western Scotland // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75. – P. 6275–6281.
11. Schmidt T., Venter E. H., Picard J. A. Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates // Journal of the South African Veterinary Association. – 2010. – Vol. 81. – P. 87–92.
12. Zhao H., Liu H., Du Y., Liu S., Ni H., Wang Y., Wang C., Si W., Yang J., Ling J. Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Campylobacter fetus* in cattle // Res. Vet. Sci. – 2010. – Vol. 88. – P.446–451.

RESEARCH CAMPYLOBACTER IN ENVIRONMENTAL OBJECTS

Yakubchak O.M., Lapa O.Y.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Purpose – to conduct research bacteria of the Campylobacter genus in environmental objects (water, food and litter) on dairy farms by polymerase chain reaction.

Materials and methods. The Materials of researches are water drinking bowls, hay and silage mixture of feeders, silage and hay mixture with composition and litter on the farm.

Researches conducted in State Scientific control institute of biotechnology and strains of microorganisms.

The results. Sample preparation for DNA isolation of Campylobacter research trial conducted according to the «Methodological guidelines for the selection, handling, storage and sample preparation of biological material for diagnostic PCR.» DNA isolation from test material was performed by PCR Amplias meaning of test systems «DNA Sorbo-B-50.» Detection of PCR amplification products were determined electrolytic separation amplifikational mixture in shaded ethidium bromide agarose gel.

After preparation of samples and separation of pure DNA samples were subjected to electrophoresis research to detect the presence of Campylobacter. Therewith the Ethidium bromide contacted with fragments of double-stranded DNA that appeared in the gel as light bars for UV radiation ($\lambda = 290-330$ nm). For visualize these bands were used a special device – transilyuminate and the results documented pictures. As a positive control used scale DNA containing Campylobacter DNA fragments of different lengths to estimate the size of PCR reaction products.

Our research have shown that water, food and litter to feeding reacted positively on presence of bacteria of the Campylobacter genus. DNA fragments divided by the molecular weight in agarose gels. The specificity of the amplified DNA bands confirmed their placement relative molecular weight markers and a positive control amplification fragment.

Thus, the objects of the farm environment contaminated bacteria of the Campylobacter genus. Failure of proper sanitary-hygienic requirements for slaughter and primary processing of animals are contributes to contamination products of slaughter by campylobacters.

Conclusion. Researches have established that bacteria of Campylobacter present in the farm's environment, namely: water, food in feeding and litter that can later enter to the body of animals.

Keywords: campylobacters, cattle, dairy farms, food, water, litter, polymerase chain reaction.