

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ СЕЛЕКТИВНОЇ ДОМІШКИ ДО ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ІЗОЛЯЦІЇ *CAMPYLOBACTER SPP.*

О.І. Касяненко, д.вет.н., професор, С.М. Гладченко, аспірант
Сумський національний аграрний університет

У статті наведено результати визначення бактерицидних концентрацій антимікробних препаратів: гентамицину, колістину, рифампіцину, цефалексину, триметоприму, фузидину по відношенню до культур *Campylobacter jejuni subsp. jejuni*, *L. monocitigenes*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *P. multocidae* та мікроміцетів родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Результати експериментальних досліджень дозволили визначити оптимальний склад антимікробних засобів селективної домішки, додавання якої до поживних середовищ для ізоляції *Campylobacter spp.* дозволить уникнути попереджувального росту супутньої мікрофлори та проводити селективну ізоляцію кампілобактерій з харчових продуктів, води і об'єктів зовнішнього середовища. Ефективність застосування запропонованої комбінації антимікробних засобів в ході селективної ізоляції *Campylobacter spp.* вивчали на основі поживного щільного середовища для культивування кампілобактерій з використанням суміші тест-культур бактерій.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Загальносвітова тенденція посилення контролю за збудниками зоонозів пов'язана з щорічним збільшенням кількості харчових токсикоінфекцій (сальмонельозу, кампілобактеріозу, лістеріозу тощо) серед населення країн Європи та світу. Щорічні доповіді Європейського Агентства з безпеки продуктів харчування за період 2006-2016 рр. констатують достовірне збільшення кількості випадків виявлення цих патогенів в м'ясі птиці, виробленому в ЄС. Згідно зі статтею 5 Директиви 2003/99/ЄС Європейського Парламенту і Ради Європи від 17 листопада 2003 року встановлені узгоджені програми моніторингу, оцінки ризиків та встановлення вихідних значень щодо зоонозів та зоонозних збудників на рівні держав-членів ЄС. Наукові експерти EFSA ухвалили технічні умови для дослідження стану моніторингу *Campylobacter* серед поголів'я бройлерів та тушок птиці та узгодженої програми з гармонізованого моніторингу сальмонели та *Campylobacter* у м'ясі бройлерів у країнах-членах ЄС [1–5].

Складність ізоляції мікроорганізмів роду *Campylobacter* із з харчових продуктів, води, об'єктів зовнішнього середовища та патологічного матеріалу обумовлюється попереджачим ростом на поживних середовищах супутньої мікрофлори. Селективна ізоляція кампілобактерій передбачає обов'язкове внесення до складу поживних середовищ суміші селективних компонентів. При цьому доцільно враховувати рівень чутливості збудників до антимікробних препаратів, що входять до складу селективних домішок. Тому актуальним і першочерговим завданням є визначення чутливості ізолятів бактерій культур та мікроміцетів до дії антимікробних препаратів селективної домішки, що додається до поживних середовищ [5–10].

Метою роботи було визначити склад компонентів антимікробних препаратів селективної домішки для поживних середовищ для ізоляції *Campylobacter spp.* шляхом визначення бактерицидної та фунгіцидної концентрації препаратів по відношенню до культур мікроорганізмів, які найчастіше проявляють попереджачий ріст на поживних середовищах і унеможливають виділення *Campylobacter spp.*, як наслідок - забезпечити достовірність та ефективність досліджень.

Матеріали і методи. Порядок та метод визначення бактерицидних концентрацій антибіотиків гентамицину, колістину, рифампіцину, цефалексину, триметоприму, фузидину

проводили керуючись «Методикою визначення бактеріостатичної та бактерицидної концентрації антибактеріальних препаратів методом подвійних серійних розведень», (2003), який регламентує основні положення проведення експериментальної роботи та дозволяє забезпечити належну якість досліджень. Дослідні серії антибактеріальних препаратів виготовлені за технологією і на обладнанні науково-контрольної лабораторії ТзОВ «Бровафарма». В якості тест-культур використовували *E. coli* (серовар O2, штамп № 157), *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* та культури *S. enteritidis*, *L. monocitogenes*, *P. multocidae*, мікроміцети родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, ізольованих попередньо нами із м'яса птиці. Культури мікроорганізмів вирощували на м'ясо-пептонному агарі (МПА). Для культивування мікоміцетів використовували поживні середовища Чапека та глюкозний агар Сабуро. Із 18-24 годинних культур мікроорганізмів готували завись згідно стандарту оптичного мікробіологічного 5 міжнародних одиниць каламутності (ДНКІБШМ).

Результати та обговорення. За результатами проведених досліджень нами була розроблена система контролю кампілобактеріозної інфекції птиці. Вона передбачає етапи контролю на всьому ланцюгу обігу продукції: від виробництва до реалізації. Одним із них є організація та проведення комплексу лабораторних досліджень на основі застосування ефективних засобів та аналітичних методів дослідження.

Для підвищення ефективності лабораторно-діагностичних досліджень при індикації збудників *Campylobacter spp.* доцільно застосовувати поживні середовища з селективною домішкою. Відомі методи селективної ізоляції недостатньо ефективні за рахунок того, що до їх складу не входять фунгіцидні препарати. Крім того, більшість компонентів селективних домішок не випускаються вітчизняною фармакологічною промисловістю, а закордонного виробництва, що обумовлює значні матеріальні затрати на витратні матеріали.

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб селективної ізоляції мікроорганізмів роду *Campylobacter* (Пат. на корисну модель 65594 Україна, МПК (2011. 01) C12N 1/00 Спосіб селективної ізоляції мікроорганізмів роду *Campylobacter* із харчових продуктів / Фотіна Т. І., Березовський А. В., Касяненко О. І.; заявник та правовласник Сумський НАУ. – № u 2011 06159 ; заявл. 17.05.2011 ; опубл. 12.12.2011, Бюл. № 23). Однак, даний спосіб недостатньо ефективний за рахунок того, що до складу селективної домішки не включені фунгіцидні препарати, що пригнічують ріст грибової мікрофлори. В основу винаходу поставлена задача створити спосіб селективної ізоляції мікроорганізмів роду *Campylobacter* з харчових продуктів шляхом удосконалення відомої селективної домішки, забезпечити достовірність та ефективність досліджень, добитися збільшення частоти ізоляції кампілобактерій з харчових продуктів та об'єктів зовнішнього середовища.

Поставлену задачу вирішували створенням способу селективної ізоляції *Campylobacter spp.* з харчових продуктів, що включає додавання до складу поживного середовища (ТУ У 24.4.-14332579-056:2010) домішки антимікробних препаратів за складом, мг: гентаміцин сульфат 2,0; цефалексин 156; рифампіцин 150, фузидин 2 мг на 1 л поживного середовища, інкубації посівів в мікроаерофільних умовах впродовж 18-24 годин при температурі +37–42°C. Результати визначення концентрацій антимікробних препаратів що пригнічують ріст мікроорганізмів представлено в табл. 1.

Отримані дані дозволяють підібрати ефективну селективну домішку для поживних середовищ з метою селективної ізоляції *Campylobacter spp.* з харчових продуктів, води та об'єктів зовнішнього середовища. Для селективної ізоляції *Campylobacter spp.* до складу поживних середовищ рекомендовано включати комбінацію антибактеріальних препаратів за складом: гентаміцин 2 мг/1 л для пригнічення росту *L. monocitogenes*; цефалексин 156 мг/1л для пригнічення росту *S. enteritidis* та *E. coli* та рифампіцин 250 мг/1л для пригнічення росту *P. multocidae* та фузидин 2 мг/1л для пригнічення росту мікроміцетів родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*.

Таблиця 1 – Результати визначення бактеріостатичних концентрацій антибактеріальних препаратів до циркулюючих штамів мікроорганізмів

№ пробірки ряду	Концентрація препарату, мкг/мл	Дослід (культура мікроорганізмів)								Контроль (культура мікроорганізмів)										
		C. jejuni	L. monocitogenes	S. enteritidis	E. coli	P. multocida	Aspergillus	Penicillium,	Fusarium	МПА, с. Чапека	C. jejuni	L. monocitogenes	S. enteritidis	E. coli	P. multocida	Aspergillus	Penicillium,			
основний розчин гентаміцину з концентрацією 1000 мкг/1 мл																				
7	7,81	+	–	–	–	+				–	+	+	+	+	+					
8	3,91	+	–	+	–	+				–	+	+	+	+	+					
9	1,95	+	–	+	+	+				–	+	+	+	+	+					
основний розчин колістину сульфату з концентрацією 3333 мкг/мл																				
4	208,312	–	–	–	–	–				–	+	+	+	+	+					
5	104,156	–	–	+	+	–				–	+	+	+	+	+					
6	52,078	+	–	+	+	+				–	+	+	+	+	+					
7	26,039	+	–	+	+	+				–	+	+	+	+	+					
8	13,019	+	+	+	+	+				–	+	+	+	+	+					
основний розчин триметоприму з концентрацією 3333 мкг/мл																				
1	1666,50	–	+	–	–	+				–	+	+	+	+	+					
2	833,25	–	+	–	–	+				–	+	+	+	+	+					
3	416,625	+	+	–	–	+				–	+	+	+	+	+					
4	208,312	+	+	+	+	+				–	+	+	+	+	+					
основний розчин цефалексину з концентацією 20000 мкг/1мл																				
3	2500	–	–	–	–	–				–	+	+	+	+	+					
4	1250	–	+	–	–	–				–	+	+	+	+	+					
5	625	+	+	–	–	–				–	+	+	+	+	+					
6	312,5	+	+	–	–	+				–	+	+	+	+	+					
7	156,25	+	+	–	–	+				–	+	+	+	+	+					
8	78,125	+	+	+	+	+				–	+	+	+	+	+					
основний розчин рифампіцину з концентацією 1000 мкг/1мл																				
1	500	+	+	+	–	–				–	+	+	+	+	+					
2	250	+	+	+	+	–				–	+	+	+	+	+					
3	125	+	+	+	+	+				–	+	+	+	+	+					
основний розчин фузидину з концентацією 1000 мкг/1мл																				
7	7,81	+					–	–	–							+	+	+		
8	3,91	+					–	–	–							+	+	+		
9	1,95	+					–	–	–							+	+	+		

Примітка: 1. «-» – ріст колоній бактерій відсутній; 2. «+» – ріст колоній бактерій на поверхні поживного середовища.

Ефектність такої комбінації антибактеріальних засобів в ході селективної ізоляції *Campylobacter* spp. вивчали на основі поживного щільного середовища для культивування кампілобактерій (ТУ У 4.4.-14332579-056:2010) з використанням суміші тест-культур бактерій (табл. 2).

В якості тест-культур супутньої мікрофлори використовували ізоляти, попередньо виділені нами із м'яса птиці.

Вихідні концентрації кампілобактерій і супутньої мікрофлори готували з концентрацією мікробних клітин 1×10^9 в 1 см^3 фізіологічного розчину, в подальшому проводили послідовне десятикратне розведення заданої концентрації ($1 \times 10^1 - 1 \times 10^9$).

Суспензії кампілобактерій і супутньої мікрофлори кожного розведення в об'ємі по 0,1 мл висівали на поверхню поживного щільного середовища для культивування кампілобактерій з селективною та без селективної домішки.

Посіви інкубували при температурі 37°C в мікроаерофільних умовах. Облік результатів посівів на живильних середовищах проводили щодоби протягом 12 діб.

На середовищі поживному щільному для культивування кампілобактерій (без додавання рекомендованої комбінації антибактеріальних засобів) культури супутньої мікрофлори проявляли попереджуючий ріст щодо *Campylobacter* spp. Так як ріст культур супутньої мікрофлори: лістерій, сальмонел, ешерихій, пастерел, стафілокока, протей і мікроскопічних грибів – реєстрували через добу культивування.

На поживному середовищі з експериментальною селективною домішкою продовж 1-12 діб після посіву і культивування реєстрували ріст лише культур кампілобактерій, ознак росту супутньої мікрофлори виявлено не було. Слід зазначити, що час реєстрації ознак росту кампілобактерій залежав від концентрації бактерій в посівній дозі. Мінімальна доза кампілобактерій, що забезпечувала ріст культур на поверхні селективного поживного щільного середовища для культивування кампілобактерій складала $1 \times 10 - 1 \times 10^3$ мко/мл.

Лабораторну діагностику кампілобактеріозної інфекції птиці необхідно здійснювати відповідно до "Методичних рекомендацій з виділення мікроорганізмів роду *Campylobacter* spp. продукції птахівництва та порядку її ветеринарно-санітарної експертизи", (затв. Науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України, протокол № 1 від 23 грудня 2010 р.). Для проведення бактеріологічного контролю птиці пропонуємо використовувати розроблене нами Середовище поживне щільне для культивування кампілобактерій" (Пат. на корисну модель 36641 Україна, МПК (2006) C12N 1/00.; ТУ У 24.4-14332579-056:2010) та селективну домішку до поживних середовищ для ізоляції *Campylobacter* spp. (Пат. на корисну модель 107433 Україна, МПК (2016. 01) C12N 1/00 Спосіб селективної ізоляції мікроорганізмів роду *Campylobacter* із продуктів тваринного походження і об'єктів зовнішнього середовища / Касяненко О.І., Гладченко С.М.; заявник та правовласник Сумський НАУ. – № у 201510861 ; заявл. 06.11.2015 ; опубл. 10.06.2016, Бюл. № 11.)

ВИСНОВКИ

1. Фунгіцидна концентрація фузидину для пригнічення росту мікроміцетів родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* складає 1,95 мкг/мл.
2. З метою селективної ізоляції *Campylobacter* spp. до складу поживного середовища достатньо включати комбінацію з трьох антибіотиків одного фунгіцидного засобу за наступним складом: гентаміцин сульфат – 2 мг/1 л для пригнічення росту *L. monocitogenes*; цефалексин 156 мг/1л для пригнічення росту *S. enteritidis* та *E. coli* та

рифампіцин 250 мг/л для пригнічення росту *P. multocidae*, фузидин 2 мг/л для пригнічення росту мікроміцетів родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*.

Перспективи подальших досліджень. Реалізація задуму проведення селективної ізоляції мікроорганізмів роду *Campylobacter* дозволить організувати моніторинг поширення даних мікроорганізмів серед продукції птахівництва та об'єктів зовнішнього середовища.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА СЕЛЕКТИВНОЙ ДОБАВКИ К ПИТАТЕЛЬНЫМ СРЕДАМ ДЛЯ ИЗОЛЯЦИИ CAMPYLOBACTER SPP.

О.И. Касьяненко, С.М. Гладченко
Сумский национальный аграрный университет

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье представлены результаты определения бактерицидных концентраций антибиотиков гентамицина, колистина, рифампицина, цефалексина и триметоприма по отношению к культурам *Campylobacter jejuni subsp. jejuni*, *L. monocitigenes*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *P. multocidae*, родов микромицетов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Результаты исследований позволили определить оптимальный состав рецепта селективной добавки, добавление которой к питательным средам для изоляции *Campylobacter spp.* позволит избежать предупреждающего роста сопутствующей микрофлоры и проводить селективную изоляцию кампилобактерий из пищевых продуктов, воды и объектов внешней среды.

Эффективность применения предложенной комбинации антибиотиков в ходе селективной изоляции *Campylobacter spp.* изучали на основе питательной плотной среды для культивирования кампилобактерий с использованием смеси тест-культур бактерий.

EXPERIMENTAL DETERMINATION OF COMPOSITION OF SELECTIVE ADDITION TO NOURISHING ENVIRONMENTS FOR ISOLATION OF CAMPYLOBACTER SPP.

O.I. Kasjanenko, S. M. Gladchenko
Sumy National Agrarian University

S U M M A R Y

In the article presents results of determination of bactericidal concentrations of antibiotics of gentamicin, kolistin sulfate, trimethoprim, rifampicina, cefalexin in relation to the cultures of *Campylobacter jejuni subsp. jejuni*, *L. monocitigenes*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *P. multocidae*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. The results of experimental researches allowed to define composition of chemotherapeutic facilities of selective addition adding of which to the nourishing environments for the isolation of *Campylobacter spp.* will allow to avoid warning growth of concomitant microflora and conduct the selective isolation of *Campylobacter spp.* from food products, water and external environment.

Efficiency of application of the offered combination of anti-infectives during the selective isolation of *Campylobacter spp.* studied on the basis of nourishing dense environment for cultivation of *Campylobacter spp.* with the use of mixture of test-cultures of bacteria.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Directive 2003/99/EC of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 97/117/EEC.
2. EC (Commission Decision) № 2007/516/EC of 19 July 2007 concerning a financial contribution from the Community towards a survey on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in broiler flocks and on the prevalence of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in broiler carcasses to be carried out in the Member States. (OJ L 190, 21.7.2010. – P. 25-37).
3. Food & Drug Administration «Isolation of *Campylobacter* Species from Food and Water» Bacteriological Analytical Manual Online. – <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/ban.7.html>
4. Berrang M. E. Prevalence and numbers of *Campylobacter* on broiler carcasses collected at rehang and postchill in 20 US Processing plants / M. E. Berrang, J. S. Bailey, S. F. Altekruze // J Food Prot. – 2015. – № 70. – P. 1556-1560.
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. Кюрчев О.М. Ефективність селективних домішок до поживних середовищ для ізоляції термостабільних кампілобактерій Наук.-техн. Бюлетень Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок / О.М. Кюрчев, В.А. Ушкалов, Л.М. Виговська, О.І. Касяненко – Вип. 12. - № 3,4 – Львів, 2011.– С. 376–380.
7. Методика визначення бактеріостатичної та бактерицидної концентрації антибактеріальних препаратів методом серійних розведень / Державний науково-контрольний інститут ветеринарних препаратів а кормових добавок; редкол.: М.В. Косенко [та ін.]. – Київ, 2003. – 6 с.
8. Микробиологические и вирусологические методы исследования в ветеринарной медицине. Справочное пособие / [А.Н. Головкин, В.А. Ушкалов, В.Г. Скрышник и др.]. – Харьков: НТМТ, 2007. – 512 с.
9. 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. – 28 с. – (Національний стандарт України).
10. Пат. на корисну модель 65594 Україна, МПК (2011. 01) C12N 1/00 Спосіб селективної ізоляції мікроорганізмів роду *Campylobacter* із харчових продуктів / Фотіна Т. І., Березовський А. В., Касяненко О. І.; заявник та правовласник Сумський НАУ. – № u 2011 06159 ; заявл. 17.05.2011 ; опубл. 12.12.2011, Бюл. № 23.

Рецензент: Улько Л.Г., д.вет.,н., професор