

**О. И. Касьяненко, Т. И. Фотина, А.А. Фотина, С. М. Гладченко,
Т. Ю. Гниденко, Р. В. Безрук**

*Сумский национальный аграрный университет,
ул. Г. Кондратьева, 160, Сумы, 40021, Украина*

СВОЙСТВА ШТАММОВ *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ПРОДУКТОВ ПТИЦЕВОДСТВА

Целью работы было определение свойств 17 штаммов *Campylobacter jejuni*, изолированных из продукции птицеводства. **Методы.** *Изоляцию и идентификацию *Campylobacter sp.* проводили методами, регламентированными ДСТУ ISO 10272-1:2007 с использованием биохимических маркеров: каталазная и оксидазная активность, способность к гидролизу гиппурата натрия. Патогенность изолированных культур *Campylobacter sp.* изучали на кроликах, курах-несушках кросса Хай-секс коричневый и белых мышах. Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом, к дезинфектантам – методом последовательных серийных разведений в жидкой питательной среде. **Результаты.** На основании морфолого-культуральных признаков, способности продуцировать каталазу и оксидазу, а также учитывая другие признаки, исследуемые бактерии были отнесены к роду *Campylobacter*. Изоляты были высокочувствительными к эритромицину и тилозину, резистентными к триметоприму, рифампицину и цефалексину. Определены бактерицидные концентрации дезинфектантов по отношению к *C. jejuni*: «Би-дез» – в концентрации 0,1%, «Бровадез-плюс» – 1:10000, формальдегид – 1,5% и «ВетОкс-1000» – 20%. Штаммы *C. jejuni* были патогенными для кур, кроликов и белых мышей: LD_{50} изолятов составляет $2,0 \times 10^{8,72}$ м.к/см³. **Заключение.** Из продукции птицеводства изолировано 17 штаммов *Campylobacter jejuni*, которые были патогенны для лабораторных животных и кур-несушек.*

Ключевые слова: *Campylobacter jejuni*, продукция птицеводства, чувствительность к антибиотикам и дезинфектантам, патогенность.

Микробиологическая безопасность пищевых продуктов в связи с контаминацией их бактериями рода *Campylobacter* – актуальная проблема в мире [5]. Выявление возбудителя на всех этапах пищевой цепочки требует разработки новых и усовершенствования существующих методов диагностики [1, 6]. Стратегическими аспектами в системе контроля кампилобактериоза продукции птицеводства в ЕС и мире является разработка национальных программ на основе проведения мониторинговых исследований относительно распространения *Campylobacter sp.* среди птицепоголовья и в мясе птицы [7, 8, 9], исследование биологических свойств изолированных штаммов и контроль качества лабораторных методов исследования [2–4, 10].

Материалы и методы. Объектами исследований были штаммы *Campylobacter jejuni*, изолированные из продукции птицеводства. Работа выполнялась в условиях лаборатории качества и безопасности пищевых продуктов кафедры ветсанэкспертизы, микробиологии, зоогигиены, безопасности и качества продуктов животноводства Сумского

национального аграрного университета, отдельные фрагменты – в Государственном научно-контрольном институте биотехнологии и штаммов микроорганизмов (г. Киев).

Изоляцию и идентификацию *Campylobacter* sp. проводили методами, регламентированными ДСТУ ISO 10272-1:2007. Изоляты культивировали в термофильных и микроаэрофильных условиях (в микроанаэроустате с газогенерирующими пакетами при 37–42 С). В качестве питательных сред использовали: Brucella Agar Base M 074, Campylobacter Agar Base M 994 («HiMedia» Laboratories Pvt. Ltd., India), МПА, Preston агар, ацетатный агар, Abeuya-Hunt-Bark агар, мясо-пептонный печёночный агар (МППА), мясо-пептонный печёночный глюкозо-глицериновый агар с 0,5% сывороткой крови КРС, тиогликолевая среда, полужидкий агар (ПЖА), ПЖА с 3,5% NaCl, ПЖА с 1% желчью КРС, ПЖА с 1% глицином, ПЖА с 3,2% циститом, бульон Болтона, мясо-пептонный печёночный глюкозо-глицериновый бульон, МПБ, Ендо, среда Кларка, Фал-агар, среда Хью-Лейфсона, Левина, Китта-Тароцци. Терморезистентность изолятов изучали, оценивая их выживание в зависимости от температурного режима и длительности термической обработки. Устойчивость *Campylobacter jejuni* к действию низких температур определяли в охлажденном и замороженном мясе птицы при температуре 0–4°С и -16-18°С соответственно. В мясное пюре вносили суспензии с суточными культурами *C. jejuni* (1×10^9 клеток/100 г). Устойчивость *C. jejuni* к действию микроволн определяли в толще мышечных волокон цыплят-бройлеров массой 320–350 г. Проведено по две серии исследований при обработке микроволнами мощностью 480 и 760 Вт в течение 2, 4, 6 и 8 минут. Патогенность изолированных культур *Campylobacter* sp. изучали на кроликах массой 2,5±0,5 кг (11 месяцев), курах-несушках кросса Хайсекс коричневый (7 месяцев), белых мышах (масса 16-18 г) на основе анализа клинического симптомокомплекса у животных, а также результатов патоморфологических, гистологических и бактериологических исследований. Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом, к дезинфектантам – методом последовательных серийных разведений в жидкой питательной среде (МПБ, рН 7,2–7,4), учитывая рекомендации Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам – NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Результаты и их обсуждение. В условиях убойных цехов северо-восточного региона Украины нами впервые был изолирован *Campylobacter jejuni* из тушек и продуктов убоя птицы на разных технологических этапах переработки здоровой и больной птицы. Установлено, что изолированные штаммы *C. jejuni* – грамтрицательные, подвижные палочки, спор и капсул не образовывали, имели форму тонких спиральных или изогнутых клеток. Микроорганизмы *C. jejuni* хорошо окрашивались всеми анилиновыми красителями и фуксином Пфейфера (рис. 1).

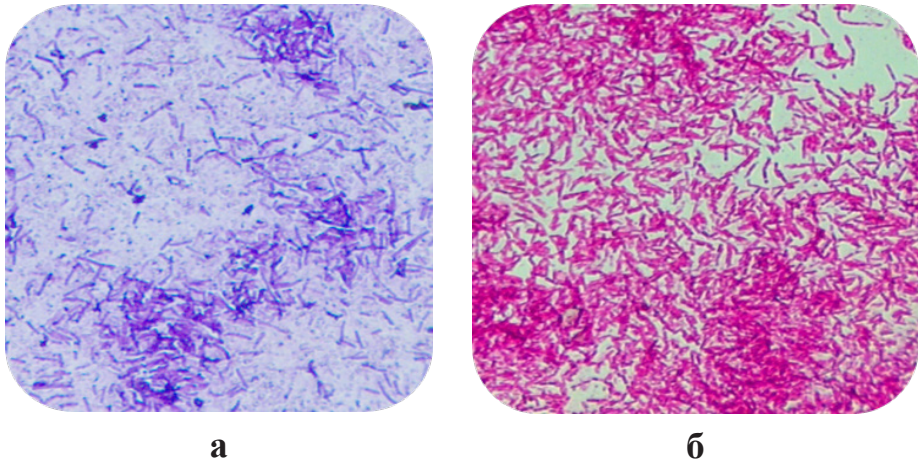


Рис. 1. Клетки штамма *Campylobacter jejuni* 2008: а – окрашенные по Граму, б – окрашенные фуксином Пфейфера

Выявлена способность клеток кампилобактерий к полиморфизму. При микроскопии 3–5-суточных культур обнаруживали овальные клетки, кокки, реже удлинённые формы, а 6-суточных культур – лишь кокковидные формы.

Исследуемые изоляты кампилобактерий в микроаэрофильных условиях росли при температуре 42°C. На плотных питательных средах рост кампилобактерий регистрировали через 24–96 часов культивирования в виде мелких, четко контурированных, влажных, блестящих, прозрачных или матовых колоний.

На среде Китт-Тароцци рост выявляли только через 96 часов культивирования в виде малозаметного вуалеобразного осадка на дне пробирки. В процессе культивирования в полужидких питательных средах (тиогликолевой среде, полужидком агаре (ПЖА), ПЖА с 3,5% NaCl, ПЖА с 1% желчью КРС, ПЖА с 1% глицином, ПЖА с 3,2% циститом) кампилобактерии через 24–48 часов образовывали колонии в виде нежных сероватых дисков, которые медленно поднимались к поверхности питательных сред.

При культивировании в жидких питательных средах (бульоне Болтона, мясо-пептонном, печеночном, глюкозо-глицериновом бульоне, МПБ) культуры кампилобактерий через 24–48 часов образовывали рыхлый осадок на дне пробирки, который при встряхивании преобразовывался в мелкие хлопья.

На основании морфолого-культуральных признаков, способности продуцировать каталазу и оксидазу, а также учитывая другие признаки, исследуемые бактерии были отнесены к роду *Campylobacter*. Они росли при температуре 37–42°C и признаки роста отсутствовали при 25°C, что отличало *C. jejuni* от других видов *Campylobacter* (*C. coli*, *C. fetus*, *C. venerialis* и *C. bubulus*).

Основным признаком, по которому дифференцировали *C. jejuni* от других исследуемых культур кампилобактерий, была способность к гидролизу гипсулата натрия. Также изоляты *C. jejuni* не продуцировали сероводород при культивировании на трисахарном агаре, проявляли резистентность к цефалотину и чувствительность к бриллиантовому зе-

леному (в разведении 1:10000). Итак, для типизации микроорганизмов рода *Campylobacter* целесообразно применять биохимические маркеры: каталазную и оксидазную активность, способность к быстрому гидролизу натрия гиппурата, отсутствию продукции сероводорода и чувствительность к налидиксовой кислоте и цефалотину.

Установлено, что исследуемые штаммы кампилобактерий были патогенными для кроликов, кур и белых мышей; вирулентность исследуемых штаммов: LD₅₀ изолятов *C. jejuni* $2,0 \times 10^{8,72}$ м.к/см³ (здесь и далее означает микробных клеток в 1 см³).

При внутривенном введении суточной культуры кампилобактерий в дозе $1,0 \times 10^9$ м.к/см³ у кроликов наблюдали угнетение, гиперемиию кожи ушных раковин, ускорение частоты пульса, тахикардию и гипертермию. При патолого-анатомическом вскрытии установили: застойную гиперемиию, отеки, дистрофическое и некротическое изменение во внутренних органах, геморрагии во внутренних органах, а также геморрагии на серозных покровах.

Регистрировали реактивные изменения в органах иммунной защиты, в частности изменения в фолликулах белой пульпы с расширением герминативных центров. При изучении гистологических срезов вышеописанных внутренних органов кроликов опытной группы также обнаруживали изменения. Исследуя гистосрезы сердца, выявили, что часть кардиомиоцитов находится в состоянии зернистой дистрофии. Регистрировали отек и фрагментацию мышечных волокон, в соединительнотканной строме местами – скопление лимфоцитов

При исследовании печени обнаруживали дисконкомплексацию печеночных балок, зернистую дистрофию гепатоцитов; разрастание и отек межчасточковой соединительной ткани, в которой местами обнаруживали скопление макрофагов и лимфоцитов. Гистосрезы печени кролика представлены на рис. 2.

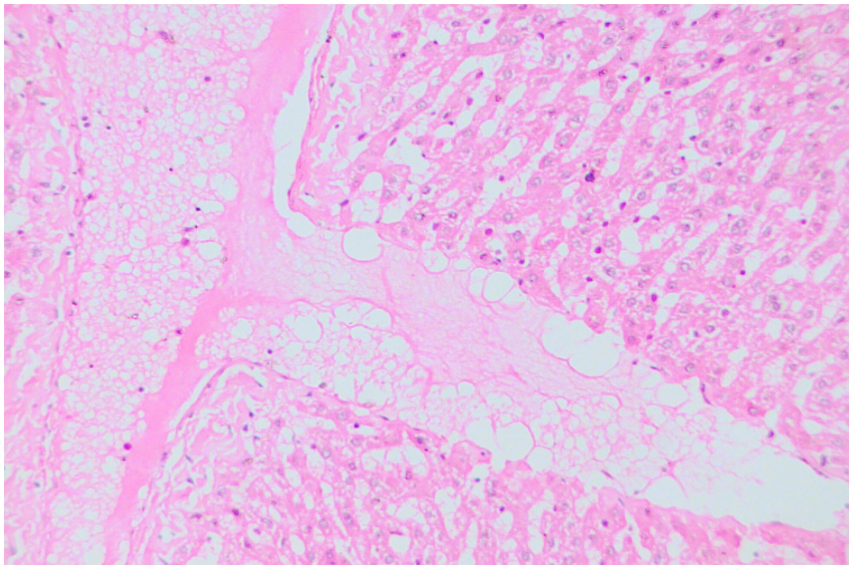


Рис. 2. Печень кролика: 1 – дисконкомплексация печеночных балок, 2 – зернистая дистрофия гепатоцитов, 3 – отек межчасточковой соединительной ткани

В почках обнаруживали зернистую и жировую дистрофию эпителия извилистых канальцев, застойную гиперемию и экстракапиллярный серозный гломерулонефрит (рис. 3).

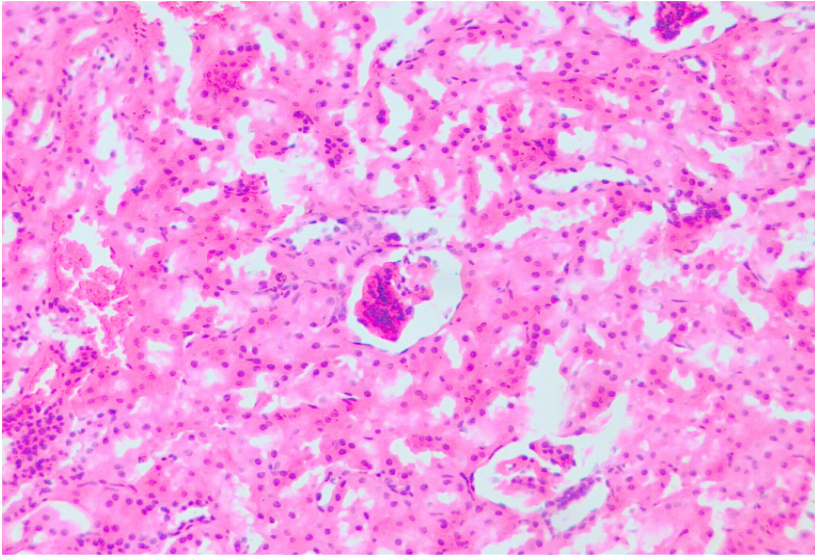


Рис. 3. Почка кролика: 1 – зернистая дистрофия эпителия извилистых канальцев, 2 – серозный экстракапиллярный гломерулонефрит

При экспериментальном заражении кур *per os* суточной культурой *S. jejuni* в дозе $1,5 \times 10^9$ м.к/см³ в объеме 1,0 см³ клинические признаки кампилобактериоза характеризовались общими неспецифическими реакциями организма птицы – угнетением, гипертермией, отказом от корма, жаждой, поносом, полным прекращением яйценоскости и резким снижением живой массы тела птицы (30–47%). Падёж птицы от интоксикации и истощения регистрировали через 2–10 суток после проявления клинических признаков. Патолого-анатомическая картина характерна для интоксикации организма: деструктивно-дистрофические изменения, застойная гиперемия и множественные некрозы в мышцах и внутренних органах (печени, селезенке, сердце, легких, почках); в репродуктивных органах – оварииты, атрофия, перерождение, разрыв фолликулов и сальпингиты.

При определении антибиотикорезистентности изолятов *S. jejuni* установлено, что исследуемые штаммы были высокочувствительными к эритромицину и тилозину; среднечувствительными – к норфлоксацину, линкомицину, ципрафлоксацину, окситетрациклину, цефазолину, стрептомицину; слабочувствительными – к гентамицину, цефалексину, амоксициллину, пенициллину, цефтриаксону, колистину; резистентными – к триметоприму, рифампицину и цефалексину.

При изучении бактерицидной активности дезинфектантов установили, что они имеют выраженное бактерицидное действие по отношению к *S. jejuni*: «Би-дез» – в концентрации 0,1%, «Бровадез-плюс» – 1:10000, формальдегид – 1,5% и «ВетОкс-1000» – 20%.

Кампилобактерии выживали в мясном пюре на протяжении 14 суток

(период исследования) при температуре 4°C. Количество жизнеспособных микроорганизмов в мясе при условии хранения при температуре минус 16–18°C со временем уменьшается. Так, через 7 суток хранения показатель КОЕ/100 г снизился на 17,6-19,8%, а через 30 суток – на 63,6-69%. Через 60 суток кампилобактерии реизолировали на уровне $4,7-5,0 \times 10^7$ КОЕ/100 г. У 76,5% штаммов, реизолированных из замороженных проб, выявлена способность формировать колонии с измененной морфологией, R-формы (средние – до 2 мм в диаметре, неправильной формы, серые, полупрозрачные, влажные). 83% культур, реизолированных из охлажденных проб, формировали колонии, характерные для S-форм (мелкие – до 1,5 мм в диаметре, округлые, полупрозрачные с сероватым оттенком, гладкие, влажные). Из замороженных образцов мяса кампилобактерии выделялись на протяжении 60 суток (срок наблюдения).

При нагревании клетки *C. jejuni* быстро инактивировались: 60°C – через 10 мин, 70°C – через 3 мин, при кипячении – через 1 мин. При обработке микроволнами уровень контаминации *C. jejuni* окорочков снижался прямо пропорционально увеличению мощности микроволновой обработки и времени выдержки, а безопасный уровень контаминации кампилобактериями мяса птицы $7,4 \times 10^3-2,0 \times 10^4$ КОЕ/г регистрировали после обработки (6 мин) микроволнами мощностью 480 Вт. Обработка контаминированных окорочков микроволнами мощностью 760 Вт (6 мин и больше) обеззараживает мясо. Полученные данные свидетельствуют о том, что бактерии вида *C. jejuni* способны длительное время выживать в контаминированной продукции птицеводства, которая при условиях недостаточной термической обработки может быть потенциальным источником пищевых токсикоинфекций человека.

Таким образом, установлено, что изолированные из продуктов птицеводства штаммы *C. Jejuni* – граммотрицательные полиморфные, слегка изогнутые, тонкие, подвижные палочки. Характерен быстрый переход в кокковую форму (через 72 ч роста). При температуре 25°C признаков роста не выявлено. Изоляты *C. jejuni* продуцировали каталазу и оксидазу; они способны к гидролизу гиппурата натрия, чувствительны к бриллиантовому зеленому (в разведении 1:10000) и налидиксовой кислоте, резистентны к цефалотину. Исследуемые штаммы были высокочувствительными к эритромицину и тилозину и резистентными к триметоприму, рифампицину и цефалексину. Бактерицидная концентрация дезинфектантов «Бровадез-плюс» – 1:10000, «Ветокс-1000» – 20%, «Бидез» – 0,1 %, формальдегид – 1,5 %. Исследуемые штаммы *C. jejuni* чувствительны к действию физико-химических факторов: при температуре минус 16–18°C (30 сут) количество кампилобактерий уменьшается на 63,6–69,0%, нагревание инактивирует возбудителя при 60°C (за 10 мин), 70°C (за 3 мин), 100°C (за 1 мин). Обработка микроволнами мощностью 480 и 760 Вт обезвреживает *C. jejuni* в течение 8 и 6 мин соответственно.

Изоляты *C. jejuni* были патогенными для кур, кроликов и белых мышей: LD₅₀ составляет $2,0 \times 10^{8,72}$ м.к/см³. При внутривенном введении суточной культуры кампилобактерий в дозе $1,0 \times 10^9$ м.к/см³ у кроликов наблюдали угнетение, гиперемию кожи ушных раковин, ускорение частоты пульса, тахикардию и гипертермию. При патолого-анатомическом вскрытии уста-

новили застоїну гіперемію, отеки, дистрофічне і некротичне змінення во внутрішніх органах; геморагії на серозних покровах. Общі неспецифічні реакції сводились к признакам гемодинамічних порушень в виде гіперемії судів різної степені, отека, кровенаповнення, лімфоїдних і еозінофільних інфільтратів во внутрішніх органах, а также реактивних змінень в органах імунної захисти, в частности, змінення в фолликулах білої пульпи с расширением гермінативних центрів.

Робота виконана в рамках проекту Програми контролю кампілобактеріоза в Україні при піддержці Государственной ветеринарної і фітосанітарної служби України.

**О. І. Касяненко, Т. І. Фотіна, Г. А. Фотіна, С. М. Гладченко,
Т. Ю. Гніденко, Р. В. Безрук**

*Сумський національний аграрний університет,
вул. Г. Кондратьєва, 160, Суми, 40021, Україна*

ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ ПРОДУКЦІЇ ПТАХІВНИЦТВА

Резюме

Метою роботи було визначення властивостей 17 штамів *Campylobacter jejuni*, що були ізолювані з продукції птахівництва. **Методи.** Ізоляцію і ідентифікацію *Campylobacter* sp. проводили методами, регламентованими ДСТУ ISO 10272-1: 2007 року з використанням біохімічних маркерів: каталазна та оксидазна активність, здатність до гідролізу гіпурата натрію. Патогенність ізолюваних культур *Campylobacter* sp. вивчали на кролях, курах-несучках кросу Хайсекс коричневий і білих мишах. Чутливість до антибіотиків визначали диско-дифузійним методом, до дезінфектантів – методом послідовних серійних розведень в рідкому поживному середовищі. **Результати.** На підставі морфолого-культуральних ознак, здатності продукувати каталазу та оксидазу, а також з огляду на інші ознаки, досліджувані бактерії були віднесені до роду *Campylobacter*. Ізоляти були високочутливими до еритроміцину і тилозину, резистентними до триметоприму, рифампіцину і цефалексину. Визначено бактерицидні концентрації дезінфектантів по відношенню до *C. jejuni*: «Бідез» – в концентрації 0,1%, «Бровадез-плюс» – 1: 10000, формальдегід – 1,5% і «ВетОкс-1000» – 20%. Штами *C. jejuni* були патогенними для курей, кролів і білих мишей: LD₅₀ ізолятів складала 2,0×10^{8,72} м.к /см³. **Заключення.** З продукції птахівництва ізолювано 17 штамів *Campylobacter jejuni*, які були патогенні для лабораторних тварин і курей-несучок.

Ключові слова: *Campylobacter jejuni*, продукція птахівництва, чутливість до антибіотиків та дезінфектантів, патогенність.

**PROPERTIES OF *CAMPYLOBACTER JEJUNI* THAT WERE ISOLATED
FROM POULTRY PRODUCTS**

Summary

The aim of our researches was to determine the properties of 17 *Campylobacter jejuni* strains that were isolated from poultry products. **Methods.** Isolation and identification of *Campylobacter* sp. we carried out by methods that are regulated by ISO 10272-1: 2007 with using biochemical markers: catalase and oxidase activity, the ability to hydrolyze of sodium hippurate. Pathogenicity of isolated cultures of *Campylobacter* sp. was examined on rabbits, chickens- hens of brown and white Hajseks cross, mice. Sensitivity to antibiotics was determined by disk diffusion method. Sensitivity to disinfectants was determined by method of successive serial dilutions at liquid nutrient medium. **Results.** The investigated bacteria were assigned to genus *Campylobacter* according to their morphological and culture features, ability to produce catalase and oxidase, and according to other signs. The isolates were highly sensitive to erythromycin and tylosin, they were resistant to trimethoprim, rifampicin and cephalexin. Bactericidal concentrations of disinfectants relative to *C. jejuni* were determined: “Bi-Des” – at 0.1%, “Brovadez-plus” – 1: 10000, formaldehyde and 1.5% “VetOks 1000” – 20%. Strains of *C. jejuni* were pathogenic for chickens, rabbits and white mice: LD₅₀ of isolates – $2,0 \times 10^{8,72}$ cells/cm³. **Conclusion.** Isolation of 17th strains of *Campylobacter jejuni* from poultry products was proved. The isolates were pathogenic for chickens, and lab. animals.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, poultry products, sensitivity to antibiotics and disinfectants, pathogenicity.

1. Березовський А.В., Фотіна Г.А. З'ясування чутливості бактеріальної флори птахогосподарств до активно діючих компонентів сучасних протимікробних засобів // Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2011. – 67. – С. 22–27.
2. Фотіна Т. І., Касяненко О.І., Фотіна Г.А., Дворська Ю.Є. Епізоотологічне та епідеміологічне значення харчових бактеріальних патогенів // Наук.-техн. бюлетень Інституту біології тварин і ДНДКІ вет. препаратів та кормових добавок. – 2014. – 15, № 2-3. – С. 141–148.
3. Dipineto L., Gargiulo A., Cuomo A. *Campylobacter jejuni* in the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) population of Southern Italy // Veterinary J. – 2012. – 179, N 1. – P. 149–150.
4. Guyard-Nicodème M., Rivoal K., Houard E. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* from chicken meat sold in French retail outlets // Int. J. Food Microbiology. – 2015. – 203. – P. 8–14.
5. Hue O., Le Bouquin S. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse // Food Microbiology. – 2010. – 27. – P. 992–999.
6. Scientific report of EFSA and ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013 // EFSA J. – 2015. – 13(1):3991. – P. 51–57.

7. *The Community summary* report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008 / European Food Safety Authority, 2010// The EFSA J. – 2010. – **8** (7). – 1658 p.
8. *Thibodeau A., Fravallo Ph., Laurent-Lewandowski S.* Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Quebec // Canadian J. Veterinary Research. – 2011. – **75**. – P. 298–307.
9. *Woldemariam E., Bouma A., Vernooij J. C. M.* The sensitivity and specificity of fecal and cecal culture for the detection of *Campylobacter* in Dutch broiler flocks quantified by Bayesian analysis // Int. J. Food Microbiology. – 2008. – **121**, N 3. – P. 308–312.
10. *Yan S. S., Gilbert J. M.* Antimicrobial drug delivery in food animals and microbial food safety concerns: an overview of in vitro and in vivo factors potentially affecting the animal gut microflora // Advanced Drug Delivery Reviews – 2014. – **56**, N 10. – P. 1497–1521.

Отримано 3.02.2016