

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ПОГОДЖЕНО
Декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології

(підпис) **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**
«____»____20____р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри екобіотехнології та
біорізноманіття

(підпис) **Олена КВАСКО**
«____»____20____р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «Оптимізація технологічного процесу виробництва
бактеріального антигену на основі *Salmonella spp.*»**

Спеціальність **162 «Біотехнології та біоінженерія»**

Освітньо-професійна програма **«Біотехнології та біоінженерія»**

Гарант освітньої програми
Кандидат біологічних наук,
доцент

(підпис) **Олена КВАСКО**

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**
Доктор сільськогосподарських
наук, доцент

(підпис) **Віра БОРОДАЙ**

Виконав

(підпис) **Олена ЛЕБЕДЄВА**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
Екобіотехнології та біорізноманіття

к.б.н., доцент _____ **Олена КВАСКО**
« ____ » _____ 2026 р.

ЗАВДАННЯ
ДО ВИКОНАННЯ БАКАЛАВРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ
ЗДОБУВАЧУ
Лебедєвій Олені Вячеславівні

Спеціальність **162 Біотехнології та біоінженерія**

Освітньо-професійна програма **«Біотехнології та біоінженерія»**

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи **«Оптимізація технологічного процесу виробництва бактеріального антигену на основі *Salmonella* spp.»**,
затверджена наказом від «30» жовтня 2025 р. №2596 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 травня 2026 року

Вихідні дані до роботи до бакалаврської кваліфікаційної роботи:
бактеріальні антигени на основі *Salmonella* spp., оптимізація технологічного процесу

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Відновлення маточної культури штамів, скринінг та отримання посівного матеріалу
2. Оптимізація середовища культивування та параметрів росту штаму серовару Enteritidis SE-54

Дата видачі завдання 1 листопада 2025 року

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

_____ **Віра БОРОДАЙ**
(підпис)

Завдання взяв до виконання

_____ **Олена ЛЕБЕДЄВА**
(підпис)

РЕФЕРАТ

Тема бакалаврської роботи «Оптимізація технологічного процесу виробництва бактеріального антигену на основі *Salmonella* spp.». Робота виконана на 47 сторінках, складається з 3 розділів, містить 14 рисунків, 4 таблиць та 37 використаних джерел.

Актуальність дослідження полягає в тому, що бактерії роду *Salmonella*, що належить до родини Enterobacteriaceae, є високопатогенними та охоплюють понад 2600 охарактеризованих сероварів, тому важливим є дослідження отримання вакцин.

Мета роботи: дослідити вплив живильних середовищ на отримання найбільш типового штаму *Salmonella* spp. та оптимізувати умови його культивування з метою найвищого накопичення біомаси культури.

Об'єкт дослідження: Оптимізація технологічного процесу виробництва бактеріального антигену на основі *Salmonella* spp.

Предмет дослідження: Штами серовару *Salmonella enteritidis* SE-54, SE-65, SE-73, SE-814 живильні середовища (SS-агар, КЛД-середовище, селенітовий бульйон (Лейфсона), м'ясо-пептонний бульйон з гідролізатом Хоттингера)

Методи дослідження: лабораторні методи приготування та стерилізації живильних середовищ, мікробіологічні методи (культивування мікроорганізмів на поживних середовищах, метод серійних розведень, підрахунок колонієутворюючих одиниць), біотехнологічні методи (визначення виходу вологої біомаси та титру бактерій за глибинного культивування), емпіричні методи (спостереження, опис, порівняння), статистичний та аналітичний підхід до оцінки результатів.

Результати досліджень та їх новизна: вперше досліджено вплив живильних середовищ (SS-агар, КЛД-середовище, селенітовий бульйон (Лейфсона), м'ясо-пептонний бульйон з гідролізатом Хоттингера) на ріст

Salmonella spp. та умови культивування штамів з метою найвищого накопичення біомаси культури.

Рекомендації щодо використання: застосування в технологічному процесі виробництва бактеріального антигену на основі *Salmonella* spp.

Ключові слова: ШТАМИ, СЕРОВАР, *SALMONELLA ENTERITIDIS*, ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА

ABSTRACT

The topic of the bachelor's thesis is "Optimization of the technological process of producing a bacterial antigen based on *Salmonella* spp."

The work is completed on 47 pages, consists of 3 sections, contains 14 figures, 4 tables and 37 sources used.

The relevance of the study lies in the fact that bacteria of the genus *Salmonella*, belonging to the Enterobacteriaceae family, are highly pathogenic and include more than 2,600 characterized serovars, therefore, research into obtaining vaccines is important.

The purpose of the work: to investigate the influence of nutrient media on obtaining the most typical strain of *Salmonella* spp. and optimize its cultivation conditions in order to achieve **the highest accumulation of culture biomass**.

Object of the study: Optimization of the technological process of producing a bacterial antigen based on *Salmonella* spp.

Subject of study: Strains of serovar *Salmonella enteritidis* SE-54, SE-65, SE-73, SE-814 nutrient media (SS-agar, KLD-medium, selenite broth (Leifson), meat-peptone broth with Hottinger hydrolysate)

Research methods: laboratory methods for preparation and sterilization of nutrient media, microbiological methods (cultivation of microorganisms on nutrient media, serial dilution method, counting colony-forming units), biotechnological methods (determination of wet biomass yield and bacterial titer during deep cultivation), empirical methods (observation, description, comparison), statistical and analytical approach to evaluating results.

Research results and their novelty: for the first time, the effect of nutrient media (SS-agar, KLD-medium, selenite broth (Leifson), meat-peptone broth with Hottinger hydrolysate) on the growth of *Salmonella* spp. and the conditions for cultivating strains with the aim of the highest accumulation of culture biomass were investigated.

Recommendations for use: use in the technological process of producing bacterial antigen based on *Salmonella* spp.

Keywords: STRAINS, SEROVAR, SALMONELLA ENTERITIDIS, NUTRIENT MEDIA

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1. Патогенність серотипів роду <i>Salmonella</i>	10
1.2. Розробка вакцин на основі нетифоїдних сальмонел 17	17
1.3. Проблеми сальмонельозу птахів в Україні та шляхи їх вирішення 20	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	24
2.1. Матеріали та об'єкти дослідження 24	24
2.2. Приготування живильних середовищ, диференціювання та ріст бактерій 26	26
2.3. Методика визначення виходу вологої біомаси та титру бактерій..... 29	29
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	30
3.1. Відновлення маточної культури, скринінг штамів та отримання посівного матеріалу 30	30
3.2. Оптимізація середовища культивування та параметрів росту штаму серовару Enteritidis SE-54..... 36	36
ВИСНОВКИ	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	43

ВСТУП

Сальмонельоз тварин - один з найбільш широко поширених зооантропонозів в багатьох країнах світу, в тому числі і в Україні (Рубленко Н. М. та ін., 2016; Чечет О.М. та ін., 2023; O.M., Lamichhane, B. et al., 2024). Патогенні сероваріанти сальмонел викликають у людей та тварин захворювання, що характеризуються різними клінічними проявами (Lamichhane, B. et al., 2024).

Приблизно 2659 сероварів *Salmonella* було ідентифіковано відповідно до схеми Вайта-Кауфмана-Ле Мінора в опублікованому додатку (№ 48–2014) (Issenhuth-Jeanjean, S., et al., 2014). Серовари *Salmonella* класифікуються на тифоїдні та нетифоїдні (НТИ) відповідно до їхньої здатності розвивати специфічну патогенність у людей і тварин (Cheng R.A., et al., 2019). Передача сальмонели людині відбувається «від ферми до виделки» та зазвичай пов'язана зі споживанням харчових продуктів тваринного походження. Серед цих джерел основними є птиця та продукти птиці, далі йдуть яловичина, свинина, риба та продукти нетваринного походження, такі як фрукти та овочі. Хоча антибіотики є основним методом лікування сальмонельозу, поява стійкості до антибіотиків та зростання кількості штамів сальмонели з множинною лікарською стійкістю (МЛС) підкреслили терміновість розробки альтернатив антибіотикам (Lamichhane, B., et al., 2024). Спалахи сальмонельозу лише у 2022 році в США спричинили близько 884 випадків у 48 штатах у період з лютого по липень, які були переважно пов'язані з птицею та продуктами птиці (Center for Disease Control and Prevention (CDC) Salmonella. [(accessed on 11 July 2023); Center for Disease Control and Prevention (CDC) Drug-Resistant Nontyphoidal Salmonella. [(accessed on 12 July 2023))]. Так, досліджено вплив синбіотика на гістоморфометрію кишечника та швидкість росту перепілок, експериментально інфікованих польовим штамом *Salmonella gallinarum* (Khan A., 2023). Особливе місце в цих дослідженнях займають бактерії роду *Salmonella* spp., які широко використовуються як модельні організми та платформи для створення

рекомбінантних антигенів і вакцин (Boiko O. et al., 2017).

Важливою перевагою використання *Salmonella spp.* у біотехнології є можливість створення пероральних вакцин, які забезпечують формування мукозального імунітету. Це особливо актуально для профілактики інфекцій, що передаються через слизові оболонки. Крім того, такі вакцини мають потенціал для масового застосування завдяки простоті введення та відносно низькій вартості виробництва.

На сучасному світовому ринку розробкою та виробництвом вакцин і бактеріальних антигенів займаються як великі фармацевтичні корпорації, так і спеціалізовані біотехнологічні компанії. Значний внесок у розвиток цього напрямку роблять такі компанії, як GlaxoSmithKline, Pfizer та Sanofi, ввітчизняна компанія БІОТЕСТЛАБ, які активно впроваджують інноваційні вакцинні платформи. Серед більш вузькоспеціалізованих компаній варто відзначити Vaxart, що займається розробкою пероральних вакцин, та Biological E. Limited, яка спеціалізується на виробництві доступних вакцин для глобального ринку. Активний розвиток цих технологій свідчить про їхню високу перспективність і значний попит у сфері охорони здоров'я.

Біотехнологія виробництва бактеріальних антигенів є одним із ключових напрямів сучасної вакцинології та імунобіотехнології.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Патогенність серотипів роду *Salmonella*

Сальмонели мають вигляд дрібних паличок із заокругленими кінцями, грамнегативні, спор і капсул не утворюють. Більшість бактерій рухомі, мають по всій поверхні джгутики (перетрихи) (рис.1.1).

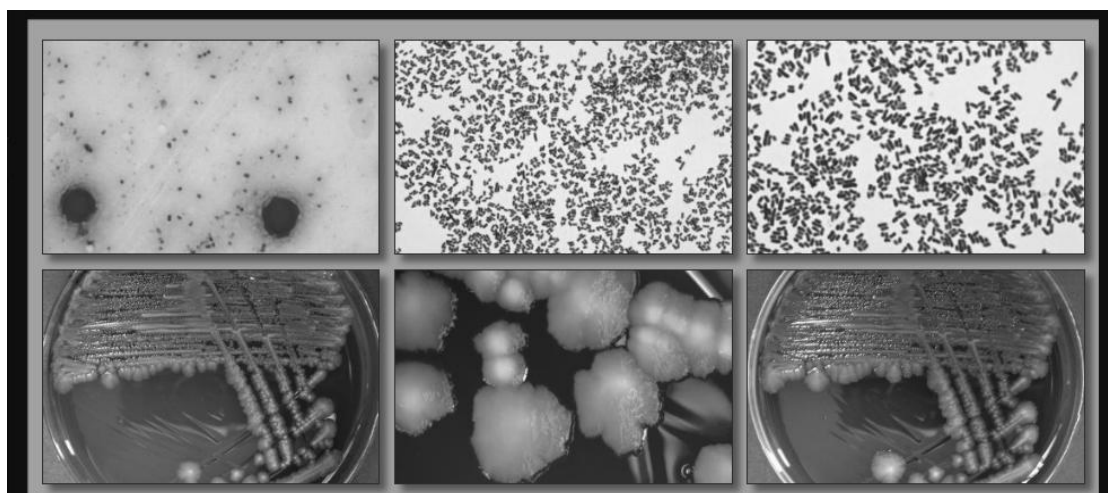


Рис.1.1. Бактерії роду *Salmonella typhimurium* (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium) під мікроскоп та на селективних живильних середовищах (<https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BC%D0%BE%D0%BD%D0%B5%D0%BB%D0%B0>

Продукують екзотоксини, зокрема, ентеротоксини (термолабільний і термостабільний), цитотоксин, мають особливу білкову систему, що запускає в ентероцитах так званий «ІІІ тип секреції». При руйнуванні сальмонели виділяють ендотоксин (ліпополісахаридний комплекс).

Мікроби здатні до внутрішньоклітинного паразитування. Добре ростуть на простих поживних середовищах (в Україні для цього використовують середовища Ендо, Плоскірева, вісмут-сульфіт агар, жовчний бульйон, адже сальмонели добре ростуть за наявності домішки жовчі, а інші збудники —

погано) при температурі від 6 до 46 °C (оптимальною є температура 35-37 °C). Сальмонели досить стійкі до дії фізичних і хімічних факторів довкілля.

Вони можуть зберігати життєздатність у воді до 3 місяців, у кормах тварин — до 1,5 року, у м'ясі та яйцях — до 7 міс., у заморожених продуктах, висушених фекаліях — до 2 років (<https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BC%D0%BE%D0%BD%D0%B5%D0%BB%D0%B0>)

Нетифоїдні включають понад 2000 серотипів, які переважно включають S. Enteritidis, S. Typhimurium, S. Newport та S. Heidelberg, і можуть інфікувати як людей, так і тварин (Rabsch W., Tschäpe H., Bäumler A.J., 2001).

Деякі серовари NTS, такі як S. Typhimurium фаготипу DT2, S. Abortusovis, S. Typhisuis, S. Gallinarum та S. Pullorum, в першу чергу інфікують голубів, овець, свиней, водоплавних птахів та свійську птицю відповідно, тоді як S. Dublin та S. Choleraesuis в першу чергу інфікують велику рогату худобу та свиней (Branchu P., et al., 2018; Saraf S., et al., 2021; Porwollik S., et al., 2005).

За дослідженнями Рубленко Н. М. та ін. (2016;2020; 2021) до вибірки 57 польових штамів входили ізоляти, виділені на даному етапі та ізоляти, що надходили з регіональних лабораторій ветеринарної медицини в Україні.

До вибірки увійшли 22 (38,6 %) ізоляти серовару Enteritidis, 14 (24,6 %) ізолятів Typhimurium, 6 (10,53 %) – Gallinarum Pullorum. Останні не диференціювали за біоваром, а вважали одним сероваром. Також було відібрано 4 (7 %) ізоляти Infantis, 3 (5,3 %) ізоляти Virchow, 2 (3,5 %) ізоляти Heidelberg, 1 (1,8 %) ізолят Nadar, 1 (1,8 %) ізолят Kentucky та 4 (7 %) нетипованих ізоляти виду *Salmonella enterica* (рис. 1.2).

Зовнішня мембрана (ЗМ) *сальмонели* – це складний, асиметричний та динамічний бар'єр, який є важливим для виживання, патогенності та резистентності до антимікробних препаратів *сальмонели* (рис.1.3).

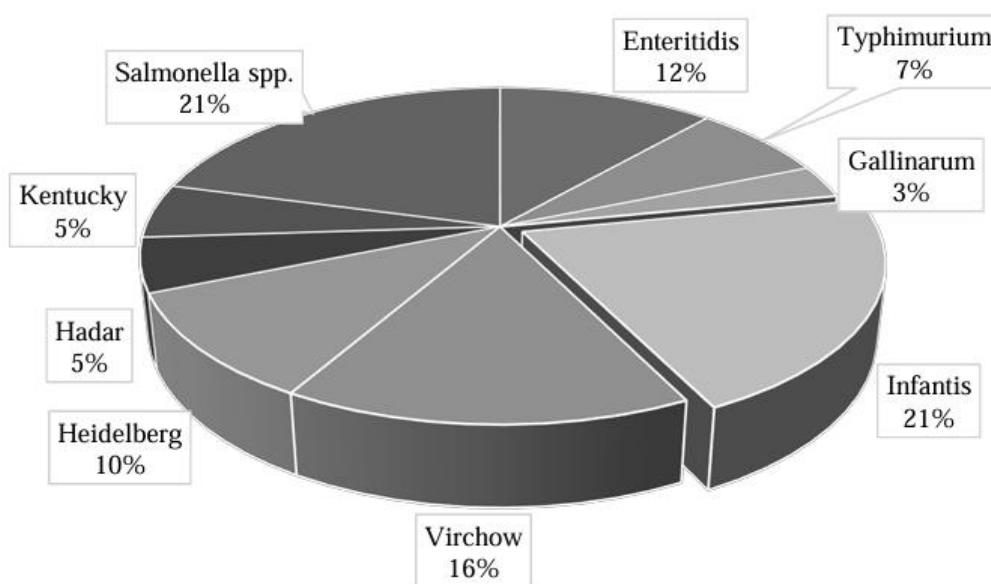


Рис.1.2. Розподіл групи польових штамів (n=57) за сероварами
(Рубленко Н. М. та ін. (2021))

Вона має три основні компоненти, а саме білки, ліпополісахариди та фосфоліпіди. Клітинна оболонка сальмонел містить складну структуру ліпополісахариду (ЛПС), яка вивільняється під час лізису клітини та, певною мірою, під час культивування

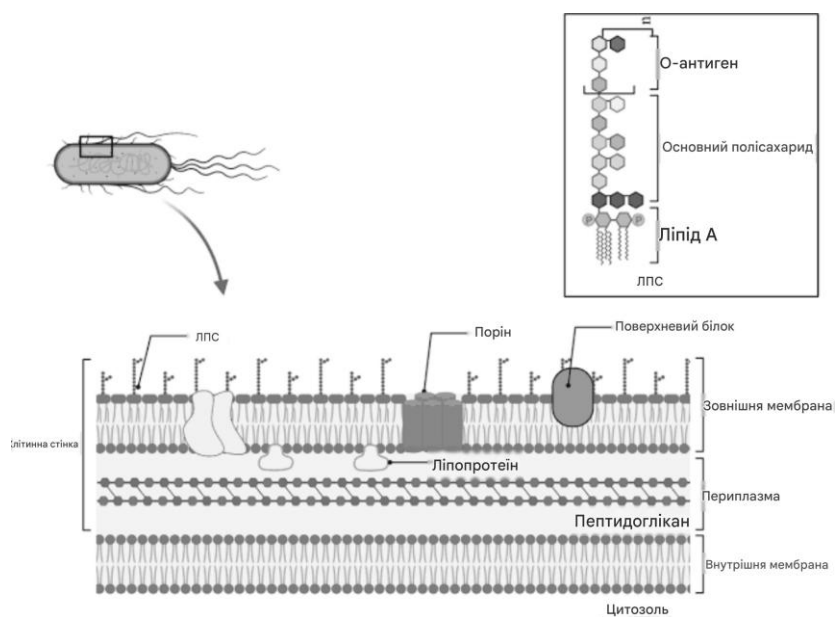


Рис. 1.3. Будова зовнішньої мембрани бактерій роду *Salmonella*
(Horlock, A., 2022).

. Ліпополісахаридний фрагмент може функціонувати як ендотоксин і може бути важливим для визначення вірулентності організмів. Ліпополісахариди *Salmonella* складаються з трьох різних структурних доменів: (1) ліпиду А, який утворює ендотоксичне ядро та регулюється двокомпонентною регуляторною системою PhoP/PhoQ; (2) полісахариду ядра, який виконує функцію структурного зв'язування; та (3) О-антигену, який визначає специфічність серотипу та сприяє уникненню імунної відповіді.

Сальмонельоз вражає птахів усіх вікових груп. Однак молоді кури та індики дуже сприйнятливі протягом перших двох тижнів віку. Хвороба характеризується поганим станом організму, таким як скуйовджене пір'я, слабкість та анорексія (Olnood C.G., Beski S.S., Choct M., Iji P.A., 2015). Крім того, інфіковані птахи схильні тулитися одна до одної, мають діарею та кашоподібний носовий отвір, зі зниженою несучістю, а посмертне дослідження виявляє ознаки набряку печінки та селезінки з крововиливами (Tie K., et al., 2018; Sania T., et al., 2022). Дослідження показали, що понад 52% сальмонельозних інфекцій у свійської птиці спричинені *S. enteritidis*, що робить його одним з найпоширеніших серотипів *сальмонели* в США (Velasquez C.G. et al., 2018).

Біотехнологія виробництва бактеріальних антигенів є одним із ключових напрямів сучасної вакцинології та імунобіотехнології. Управління з контролю за продуктами харчування та лікарськими засобами (FDA) схвалило дві вакцини проти *сальмонели* : жива атенуйована пероральна вакцина Ty21a та внутрішньом'язова капсульна вакцина на основі полісахариду Vi, тоді як кілька інших вакцин, таких як вакцина на основі GMMA, глікокон'югована вакцина, глікокон'югована вакцина О-антигену та нові атенуйовані вакцини, все ще розробляються (Sears K.T., et al., 2021 Miletic S., et al., 2020).

Ефективність вакцин проти *сальмонели* обмежується різними факторами, такими як наявність безсимптомних носіїв, що ускладнює розробку вакцин, складні механізми уникнення імунної відповіді та наявність різноманітних

серотипів (Gordon M.A., et al., 2008). Наразі доступні вакцини проти черевного тифу забезпечують лише помірний та короточасний захист у людей (Milligan R., et al., 2018). Крім того, серотипи сальмонели є дуже мінливими, зі значним генетичним різноманіттям усередині та між господарями, що ускладнює зусилля щодо контролю збудника

Сучасні біотехнологічні підходи до отримання бактеріальних антигенів на основі *Salmonella spp.* базуються на використанні методів генної інженерії та клітинної біотехнології. Одним із найбільш перспективних напрямів є створення рекомбінантних штамів, у геном яких інтегрують гени, що кодують цільові антигени. Такі атенуйовані штами можуть використовуватися як живі векторні вакцини, здатні доставляти антиген безпосередньо до клітин імунної системи. Іншим важливим підходом є використання везикул зовнішньої мембрани (OMVs), які природно утворюються бактеріями та містять широкий спектр антигенів і молекул, що виконують ад'ювантну функцію. Подальший розвиток цієї технології привів до створення GMMА-платформи, яка забезпечує підвищений вихід антигенного матеріалу та контрольовану реактогенність. Також перспективними є технології так званих «бактеріальних привидів», які являють собою інактивовані клітини зі збереженою структурою поверхневих антигенів.

Бактерії *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) та *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*) є збудниками сальмонельозу птахів, що належать до роду *Salmonella* родини *Enterobacteriaceae*. Ідентифіковано понад 2300 серотипів сальмонели, з яких тільки 10% було виділено у свійських птахів. Відомо, що *S. enteritidis* та *S. typhimurium* є серотипами, що найчастіше виділяються від курчат, а також людей (Рубленко Н. М. та ін., 2016; Чечет О.М. та ін., 2023; Lamichhane, B., et al., 2024; Boiko O. et al., 2017).

Нині у більшості розвинених країн розробляються програми заходів, створені задля поліпшення ситуації із захворюванням, викликаним сальмонелами, які включають своєчасну і якісну діагностику. Особливу увагу слід приділити моніторингу сальмонельозу птахів. Це завдання ускладнюється

труднощами в ідентифікації штамів та серотипів через широку варіабельність вірулентних та антигенних властивостей збудника.

Найбільш специфічним компонентом бактеріальної клітини грамнегативних бактерій є ліпополісахаридний антиген, активність і специфічність якого залежать від методу отримання (Baptista D., et al., 2023). При порівняльній оцінці активності сальмонельозних антигенів в ІФА найбільш високий рівень специфічності реєстрували з антигеном, отриманим методом фенольно-водної екстракції (Baptista D., et al., 2023; Balasubramanian R., et al., 2019).

Сальмонельози – це зоонози, які можуть передаватися безпосередньо чи опосередковано між тваринами та людиною. Бактерії роду *Salmonella* досить широко поширені в кишечнику здорових птахів і ссавців, в їжі, причому найчастіше вони зустрічаються в яйцях та сирій свинині, м'ясі індичок та курок. Людині це захворювання може передаватися через заражену їжу. Зростаюча потреба в їжі, швидкий розвиток великих птахоферм та виробництво їжі в промислових масштабах були прямими причинами пандемій сальмонельозу в минулому столітті (Рубленко Н. М. та ін., 2016; Чечет О.М. та ін., 2023; Lamichhane, B., et al., 2024; Boiko O. et al., 2017).

Із сальмонельозами надзвичайно складно боротися. З одного боку, є явище серологічного розмаїття цих бактерій, з другого боку стала вельми поширеною *Salmonella* у природі. Вони стійкі до більшості відомих антибіотиків і спроби їх знищення в умовах сільського господарства пов'язані з необхідністю розробки вакцини проти кожного серовара (Barrow, P.A. (2007).

Бактерії *Salmonella* належать до родини ентеробактерій (*Enterobacteriaceae*). На підставі генетичних ознак та біохімічних властивостей *Salmonella* була поділена на два види: *Salmonella enterica* та *Salmonella bongori*. *S. enterica* включає такі підвиди: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* та *indica*. (Grimont, P.A.D. & Weill F-X, 2007).

На даний момент описано 2579 серотипів, що входять до роду *Salmonella*. Ці серотипи класифіковані на підставі присутності на їх поверхні соматичних (O), капсульних (Vi) та джгутикових антигенів (H). Ця схема, звана

схемою Кауфмана-Уайта, представляє класифікацію антигенної структури сероварів *Salmonella* і складається з 63 серогруп. Лише обмежена кількість сероварів *Salmonella* є поширеними.

Липополісахарид (антиген О, ендотоксин) відіграє важливу роль у бактеріальній клітині. Він є одним із детермінант патогенності для людини або тварин. Липополісахарид являє собою гетерополімер, що складається з трьох структурно різних областей: ліпиду А, корового олігосахариду і О-специфічного полісахаридного ланцюга. О-специфічний полісахаридний ланцюг (OPS) утворює дистальну частину липополісахариду. Вона є варіабельним фрагментом і тією частиною ендотоксину, яка стимулює утворення антитіл. Цей липополісахарид називають ендотоксином, оскільки він викликає тяжкий ускладнення у разі бактеріальних інфекцій, з такими симптомами як сепсис та септичний шок. Дослідження, проведені протягом багатьох років, дозволили авторам винаходу отримати дуже важливу інформацію про основні імуногенні властивості деяких структур цих антигенів. Це дослідження стало основою композиції полівалентної багатокомпонентної вакцини для боротьби з сальмонельозами (Lamichhane, B., et al., 2024).

Жгутиковий антиген - це поверхневий антиген, пов'язаний із присутністю джгутика на поверхні *Salmonella*. Їх особливо багато в рідкій культурі та в агарі Свена Гарда. Джгутикові антигени, Н, сальмонели зазвичай є двофазними. Більшість бактерій роду *Salmonella* переміщуються за допомогою джгутиків (Horlock, A., 2022).

Vi-антиген, навпаки, локалізований у капсулі бактеріальної клітини. Він складається з полісахариду – полі-N-ацетиламіногалатуронової кислоти. Vi-антиген продукується лише деякими штамми *Salmonella*.

Серовари *Salmonella*, що належали до кишкового підвиду (сальмонела етерика, *enterica*), є групою патогенів, що відрізняються за перевагами щодо господаря, у якого вони можуть викликати захворювання. Діапазон кращих господарів може бути дуже вузьким, як у випадку *S. Typhi*, яка інфікує тільки людей і приматів, або може бути більш широким (включати людей і багато

видів тварин), як у випадку інфекцій, що викликаються бактеріями *Salmonella Typhimurium* та *Salmonella Enteritidis* (Horlock, A., 2022; Lamichhane, B., et al., 2024).

1.2. Розробка вакцин на основі нетифоїдних сальмонел

В даний час захисна вакцинація проти сальмонел дуже популярна. Для цього використовують

1. Вакцини, що містять інактивовані (убиті) бактерії
2. Живі вакцини

Сучасні вакцини можуть містити живі атенуйовані (ослаблені), генетично модифіковані бактерії. Застосування оральних вакцин, що містять живі генетично модифіковані бактерії, проти сальмонельозів стимулює місцевий імунітет у кишечнику, а також допомагає зменшити екскрецію бактерій у оброблених тварин. Застосування цих вакцин має низку обмежень (COMMISSION REGULATION (EC) No. 1 177/2006 (директива Єврокомісії), див. нижче). Введення тварин живих бактерій у вакцині пов'язане з сильною відповіддю на ендотоксин; мали випадки захворювання та смерті тварин. Такі вакцини можуть використовуватися у разі гострої інфекції в поголів'ї, і вони не викликають імунітет у дуже молодих тварин. Застосування генетично модифікованих вакцин в перший день життя не захищало курчат від колонізації печінки та селезінки інфекційним штамом (Van Immerseel 2002.). Це пояснюється незрілістю імунної системи птахів. Дозрівання імунної системи у птахів після вилуплення займає 3 тижні. Усі відомі вакцини застосовують у тварин віком 3-4 тижнів. Виробники також рекомендують вводити ці вакцини двічі чи тричі.

Мутанти роду *Salmonella*, спосіб їх отримання і вакцини, що містять ці мутанти, причому зазначені мутанти характеризуються тим, що вони викликають відповідь, яку можна відрізнити від антитільного відповіді, викликаного штамми. Вакцина, що є серологічним маркером, спричиняє

тривалу імунізацію тварин проти широкого діапазону штамів роду *Salmonella*. Розкрито, що ослаблені у два або три рази штами бактерій інфекції у тварин, таких як *Salmonella enterica* та/або *Escherichia coli*. Мутанти містять щонайменше одну генетичну модифікацію першого типу і щонайменше одну генетичну модифікацію другого типу. Досліджено інактивовану вакцину проти сальмонельозу у голубів, яка включає штами *Salmonella typhimurium* M-5v t-DEP, *Salmonella typhimurium* D-1 v t-DEP і *Salmonella enteritidis* 25 Yav e-DE поліетиленгліколем, для внутрішньом'язового застосування (Sears K.T., et al., 2021 Miletic S., et al., 2020).

Нетифоїдні сальмонели, головним чином *S. typhimurium* та *S. enteritidis*, є основною причиною інвазивних інфекцій кровотоку. Кон'югація ліпополісахаридного О-антигену з білком-носієм є перспективною стратегією вакцинації.

Раціональний процес вибору ізолятів *Salmonella* як джерела О-антигену для розробки двовалентної глікокон'югованої вакцини може включати наступні етапи (Lanzilao L, et al., 2015):

1. Скринінг бібліотеки з 30 *S. typhimurium* та 21 *S. enteritidis*, щоб визначити найкращі штами для великомасштабного виробництва О-антигену та створення кон'югованих вакцин. Початковий скринінг базується на характеристиках росту, профілі безпеки ізолятів, виробленні О-антигену та характеристиках О-антигену з точки зору розміру молекули, рівня та положення О-ацетилювання та глюкозилювання, визначених за допомогою фенолсульфатного аналізу, ЯМР, ВЕРХ-SEC та НРАЕС-PAD.

2. Тваринні ізоляти для кожного серовару ідентифікують та використовують для синтезу кандидатних глікокон'югатних вакцин, використовуючи CRM₁₉₇ як білок-носії. Імуногенність цих кон'югатів та функціональну активність індукованих антитіл досліджують за допомогою ELISA, сироваткового бактерицидного аналізу та проточної цитометрії.

3. З відібраних ізолятів *S. typhimurium* (1418 та 2189) та два *S. enteritidis* (502 та 618) генерують глікокон'югати, здатні індукувати високі рівні

специфічних антитіл з широким охопленням серовар-специфічних штамів, і відбирають для використання у виробництві вакцин. Описаний підхід до відбору штамів потенційно застосовують для розробки глікокон'югатних вакцин проти інших бактеріальних патогенів (Lanzilao L, et al., 2015).

Спонтанне утворення частинок зовнішньої мембрани, згідно з Meloni, E., et al., 2015, можна посилити шляхом цілеспрямованого видалення білків, що беруть участь у підтримці цілісності внутрішньої та зовнішньої мембран (рис.1.4).

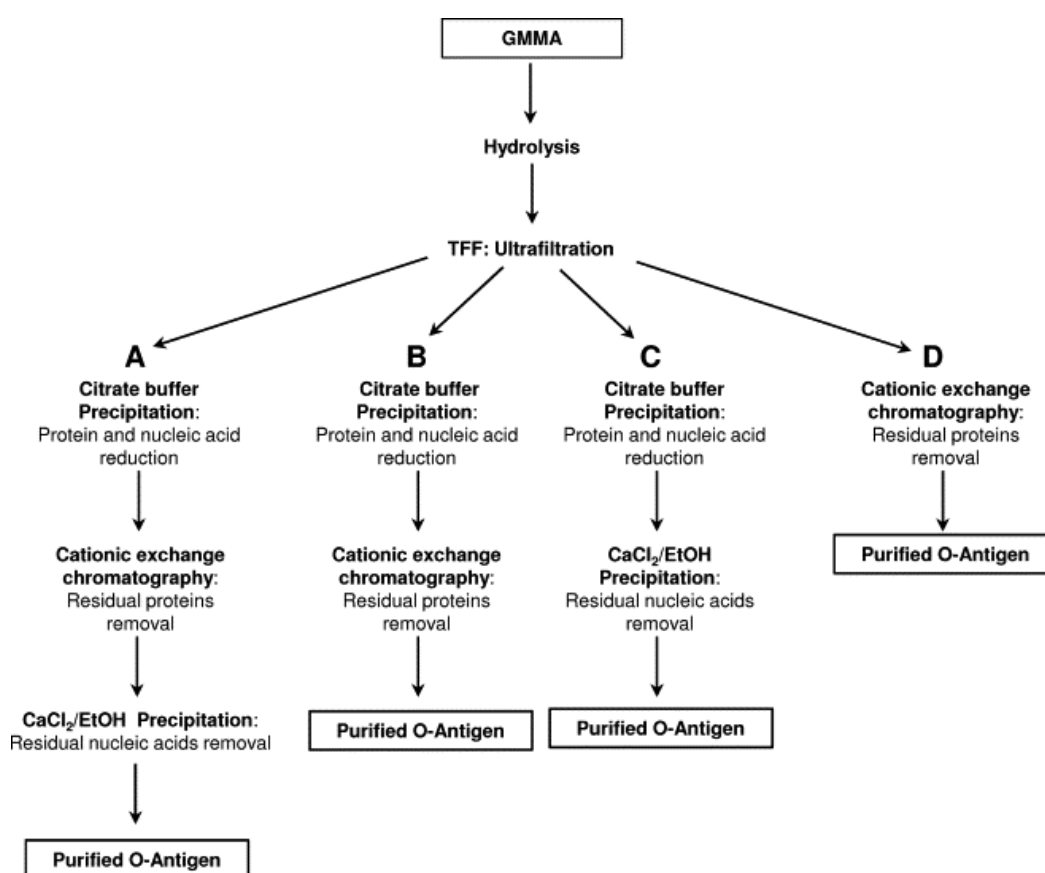


Рис. 1.4. Стратегії очищення О-антигену, починаючи з узагальнених модулів для мембранних антигенів УММА. Для оптимізації протоколу очищення О-антигену ми використовували різні підходи, починаючи з гідролізованого УММА: (А) зразок УММА обробляли за стандартним протоколом очищення О-антигену, вже розробленим для біомаси; (В) використовували лише перший етап осадження та катіонообмінну хроматографію; (С) використовували цитратний буфер та осадження $\text{CaCl}_2/\text{EtOH}$, уникаючи етапу Sartobind S; (D) використовували лише катіонообмінний фільтр (Meloni, E., et al., 2015).

Це призводить до утворення узагальнених модулів мембранних антигенів (GММА). УММА є потенційним джерелом компонентів зовнішньої мембрани для виробництва вакцин. Велика кількість УММА вивільняється під час ферментації Δ *tolR Salmonella*. УММА збагачені ЛПС, але містять низьку кількість нуклеїнових кислот та білків. Очищення О-антигену з УММА вимагає менше кроків, ніж з цілих бактерій. УММА як вихідний матеріал для виробництва вакцин має потенціал для зниження собівартості продукції (Meloni, E., et al., 2015).

1.3. Проблеми сальмонельозу птахів в Україні та шляхи їх вирішення

Птахівнича галузь має важливе значення у вирішенні продовольчої проблеми України, оскільки забезпечує потребу у товарному виробництві яєць і м'яса птиці (Чечет О.М., Мех Н.Я., Рубленко І.О. та ін., 2023). Сучасне птахівництво характеризується промисловим високотехнологічним виробництвом із застосуванням прогресивних енергозберігаючих технологій, їх механізацією та автоматизацією, спеціалізацією та концентрацією виробничих процесів, цільовою селекцією високопродуктивних кросів птиці, збалансованою годівлею. Проте, птахівнича галузь потерпає від сальмонельозів. У птахогосподарствах країни сальмонельоз є одним із найнебезпечніших бактеріальних захворювань птиці (Чечет О.М., Мех Н.Я., Рубленко І.О. та ін., 2023) (рис.1.5).

Найбільшу кількість позитивних випадків було зареєстровано у таких областях: Миколаївській (24,5 %), Запорізькій (14,6 %), Черкаській (13,7 %), Волинській (12,5 %), Київській (10,7 %), Львівській і Херсонській (по 8,6 %), Хмельницькій (5,6 %). У птахогосподарствах Західного регіону України зафіксовано лише поодинокі випадки (до 0,5 %) виділення збудників *Salmonella* spp.

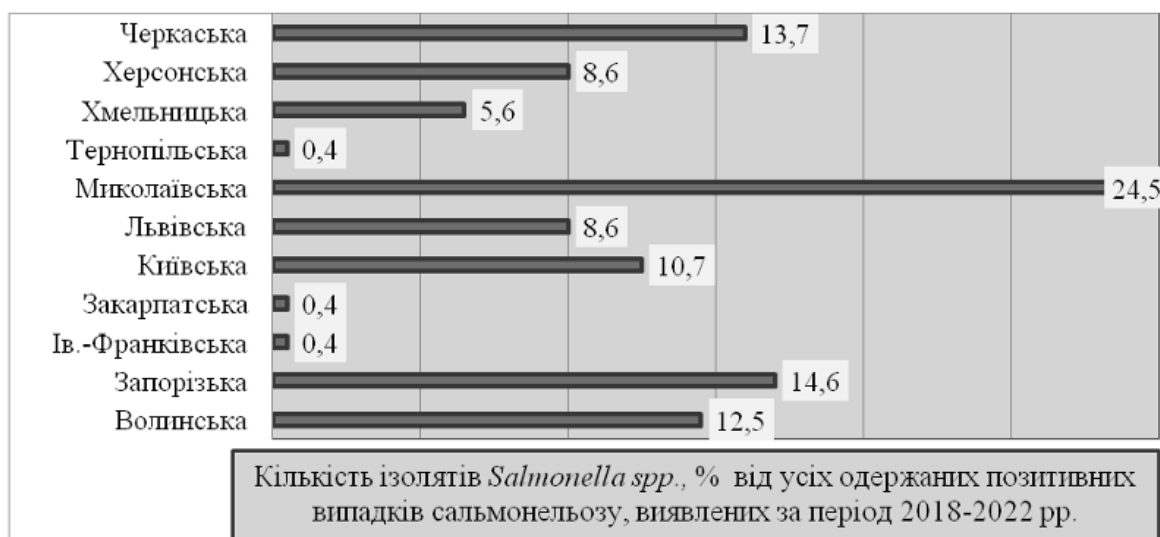


Рис.1.5. Частота виділення збудників *Salmonella* spp. із пато- та біологічного матеріалу, сировини, продукції від птиці, кормів, змивів із об'єктів довкілля у птахогосподарствах різних регіонів України за період 2018–2022 рр. (Чечет О.М., Мех Н.Я., Рубленко І.О. та ін., 2023)

БІОТЕСТЛАБ є українською вітчизняною компанією, яка більше 36 років спеціалізується на розробці, виробництві та реалізації ветеринарних препаратів. Вона входить у ТОП-20 світових лідерів за асортиментом вакцин, випускає в Україні продукцію на власних потужностях, оснащених сучасним обладнанням. Підприємство сертифіковане світовим лідером – агентством з акредитації DQS (Німеччина), на відповідність міжнародним стандартам ISO 9001:2015 та ISO 14001:2015, виробничі процеси відповідають вимогам GMP.

Завдяки якості та інноваціям, компанія БІОТЕСТЛАБ є одним із лідерів ринку ветеринарних препаратів України, найбільшим експортером імуно-біологічних та хіміко-фармацевтичних засобів для тварин і птиці (рис.1.6).

Інвазивна сальмонельозна інфекція є важливою проблемою охорони здоров'я, яка погіршується через зростання резистентності до антимікробних



Рис.1.6. Препарати і вакцини для птахівництва

препаратів та зміну сероварного спектру сальмонели. Тому важливо оптимізувати певні елементи технології отримання антигенів.

Інактивована вакцина ПОЛІМУН САЛЬМО проти сальмонельозу птиці містить штами *Salmonella enteritidis* SE-15 $\geq 10^8$ КУО; *S. typhimurium* ST-15 $\geq 10^8$ КУО; *S. gallinarum* SG-15 $\geq 10^8$ КУО (рис.1.7, 1.8).



Рис. 1.7. Інактивована вакцина ПОЛІМУН САЛЬМО проти сальмонельозу птиці на основі штамів *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum*

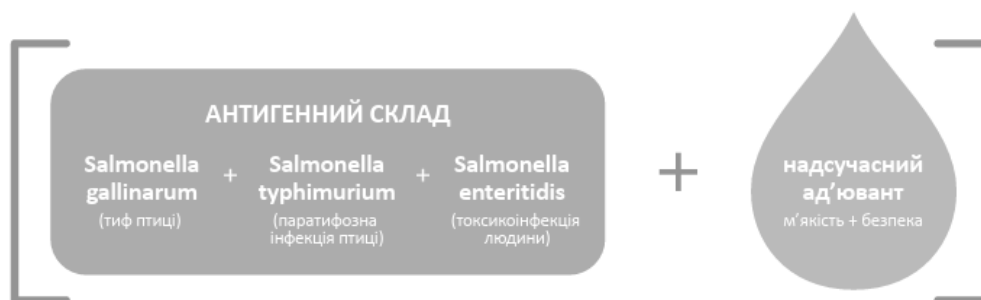


Рис.1.8. Склад препарату проти сальмонельозу птиці

Вона стимулює формування активного імунітету проти сальмонел. У птахів стійкий імунітет формується через 4 тижні після ревакцинації та триває до 57-60 тижня життя.

Біотехнологія виробництва бактеріальних антигенів на основі *Salmonella spp.* є динамічною та перспективною галуззю, що поєднує досягнення молекулярної біології, мікробіології та інженерії біопроектів. Завдяки високій ефективності індукції імунної відповіді, можливості створення різноманітних вакцинних платформ і відносно низькій собівартості виробництва, ці технології мають значний потенціал для подальшого розвитку та широкого впровадження у медичну та ветеринарну практику.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали та об'єкти дослідження

Об'єктами досліджень були бактерії роду *Salmonella*.

Домен: Бактерії (Bacteria)

Тип: Proteobacteria

Клас: Gamma Proteobacteria

Ряд: Enterobacteriales

Родина: Enterobacteriaceae

Рід: *Salmonella* (Lignieres 1900)

Рід: *Salmonella*

Вид: *Salmonella enterica*

Серовар / Серотип. *Enteritidis* (має однакову структуру поверхневих антигенів: О- та Н-антигенів).

Штами серовару *Salmonella enteritidis* SE-54, SE-65, SE-73, SE-81.

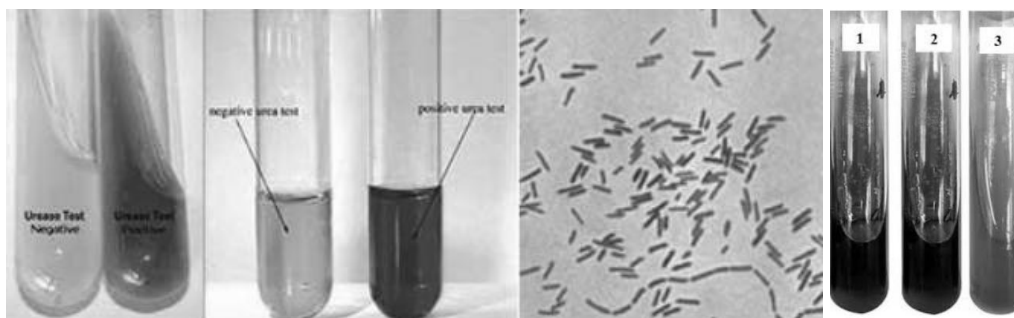


Рис.2.1. Культури бактерій роду *Salmonella*

В роботі використовували наступне обладнання та інструменти:

- ✓ бокс із зоною ламінарного потоку клас чистоти «А»;



Рис.2.2. Бокс із зоною ламінарного потоку клас чистоти «А»

- ✓ бактерицидні УФ-лампи, переносні / стаціонарні, закріплені в передбоксівому приміщенні та боксі;
- ✓ газовий пальник; пальники спиртові;
- ✓ петлі мікробіологічні;
- ✓ дозатор автоматичний на 1,0 мл зі стерильними наконечниками;
- ✓ пінцети, корнцанги з нержавіючої сталі;
- ✓ мікроскоп зі збільшенням 10x100;
- ✓ рН-метр стаціонарний;
- ✓ піпетки на 1-, 2-, 5-, 10 мл;
- ✓ ємності з дезінфікуючим розчином (3% NaOH);
- ✓ холодильник побутовий з температурою від 2 °С до 8 °С;
- ✓ термостат з температурою від 37 ± 0,5 °С,
- ✓ орбітальний шейкер.



Рис. 2.3. Орбітальний шейкер для накопичення культури

2.2. Приготування живильних середовищ, диференціювання та ріст бактерій

SS Агар (Агар Сальмонела-Шигела) для уточнення чистоти музейного зразка.

Інгредієнти, грам/літр: пептидний перевар тваринної тканини, 5,00; м'ясний екстракт, 5,00; лактоза, 10,00; жовчні кислоти, суміш, 8,50; натрію цитрат, 10,00; натрію тіосульфат, 8,50; заліза цитрат, 1,00; діамантовий зелений, 0,00033; нейтральний червоний, 0,025; агар-агар, 15,00. Кінцеве значення рН (при 25 °С) - $7,0 \pm 0,2$ (Фаріонік Т.В., Бондар М.М., 2018).

КЛД-середовище (Ксилозо-Лізин-Дезоксихолатний агар, XLD) для ідентифікації бактерій

Готується згідно з ДСТУ EN ISO 6579-1:2022 Мікробіологія харчового ланцюга. Горизонтальний метод виявлення, підрахунку та серотипування *Salmonella*. Частина 1. Виявлення *Salmonella* spp (EN ISO 6579-1:2017, IDT; ISO 6579-1:2017, IDT).

Склад, г/л: ксилоза 3.50; L-Lysine 5.00; лактоза 7.50; сахароза 7.50, хлористий натрій 5.00, дріжджовий екстракт 3.00, дезоксихолат натрію 2.50,

тіосульфат натрію 6.80, цитрат заліза-амонію 0.80, феноловий червоний 0.08, агар 13.50.

Штами бактерій висівали окремо штрихом на середовища SS Агар та КЛД-середовище, інкубували у термостаті впродовж 24 годин при температурі $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Потім візуально оцінювали морфологію колоній та перевіряли на ідентичність (Фаріонік Т.В., Бондар М.М., 2018).

Селенітовий бульйон (Лейфсона) для розмноження культури

Склад середовища, г/л: пептон ферментативний - 5 г/л; маніт - 4 г/л; натрій гідрофосфат - 7,5 г/л; натрій дигідрофосфат - 7,5 г/л; натрій селеніт - 4 г/л.

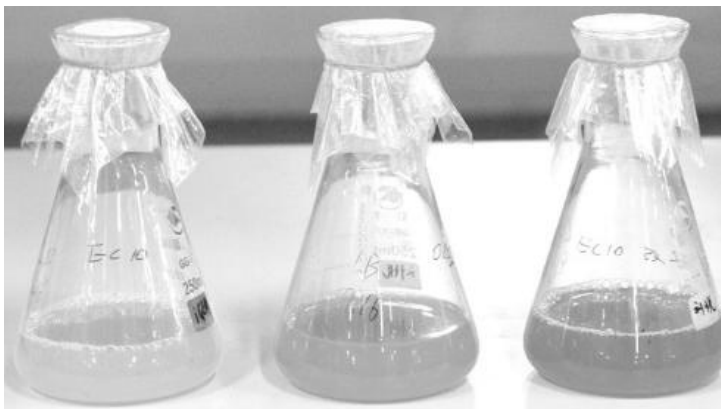


Рис. 2.4. Приготування селективних середовищ

Найбільш типові колонії для бактерій переносили у колби з Селенітовим бульйоном (Лейфсона), інкубували на орбітальному шейкері впродовж 24 годин при температурі $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, а потім візуально оцінювали характер росту субкультури (наявність дифузного помутніття та осаду) (Фаріонік Т.В., Бондар М.М., 2018).

М'ясо-пептонний бульйон з гідролізатом Хоттингера для накопичення біомаси

В якості стерильного живильного середовища для культивування бактерій (рН 7,3-7,5) використовували м'ясо-пептонний бульйон з гідролізатом

Хоттингера, який широко використовується для культивування широкого спектра патогенних та умовно-патогенних бактерій.

Таблиця 2.1. Склад м'ясо-пептонного бульйону з гідролізатом Хоттингера

Компонент	Кількість (на 1 л дистильованої води)
М'ясна вода Хоттингера (з амінным азотом 150-200 мг%)	500 мл
Пептон (ферментативний)	10 г
Натрію хлорид (NaCl)	5 - 10 г
Глюкоза (як джерело енергії)	2 г
Дистильована вода	до 1 л

Досліджували такі варіанти з вмістом амінного азоту у середовищі Хоттингера з концентрацією:

Контроль – культивування на середовищі МПА;

Варіант 1 — 1,0 г/л;

Варіант 2 (стандарт) — 1,2 г/л;

Варіант 3 — 1,4 г/л

Варіант 4 — 1,6 г/л.

Культури штамів бактерій переносили у колби з м'ясо-пептонним бульйоном з гідролізатом Хоттингера, інкубували впродовж 24 годин при температурі $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ на орбітальному шейк ері для отримання біомаси клітин і визначення їх титру.

2.3. Визначення виходу вологої біомаси після центрифугування, г/л та титру бактерій

Бактеріальну суспензію наливали до центрифужних пробірок, попередньо зважених. Осадження клітин проводили в лабораторній центрифугі (4000 об/хв. протягом 15 хвилин). Надосадову рідину зливали і пробірки повторно зважували.



Рис.2.5. Лабораторна центрифуга LMC-3000

Вихід вологої біомаси визначали за формулою:

$$X = \frac{m_1 - m_0}{V}, \text{ де:}$$

X — вихід вологої біомаси, г/л; m_1 — маса центрифужної пробірки з осадом бактерій, г; m_0 - маса порожньої пробірки, г; V — об'єм бактеріальної суспензії, взятий для проведення центрифугування, л.

Титр клітин розраховували за методом поверхневого висіву на тверде середовище Хоттингера з розведень 10^{11} , визначали КУО/г.

Досліди проводили в 3-5 кратній повторності. Статистичну обробку даних проводили в програмі Excel-2007.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Відновлення маточної культури, скринінг штамів та отримання посівного матеріалу

За результатами проведеного Чечет О.М., Мех Н.Я., Рубленко І.О. та ін. (2023) мікробіологічного моніторингу з виявлення збудників сальмонельозів у пато- і біологічному матеріалі, кормах для птиці, сировині, продукції птахівництва, об'єктах довкілля птахогосподарств за період 2018–2022 рр. виявлено зниження показників зараженості досліджуваних об'єктів від 0,06 % у 2018 р. до 0,01–0,02 % у наступних роках.

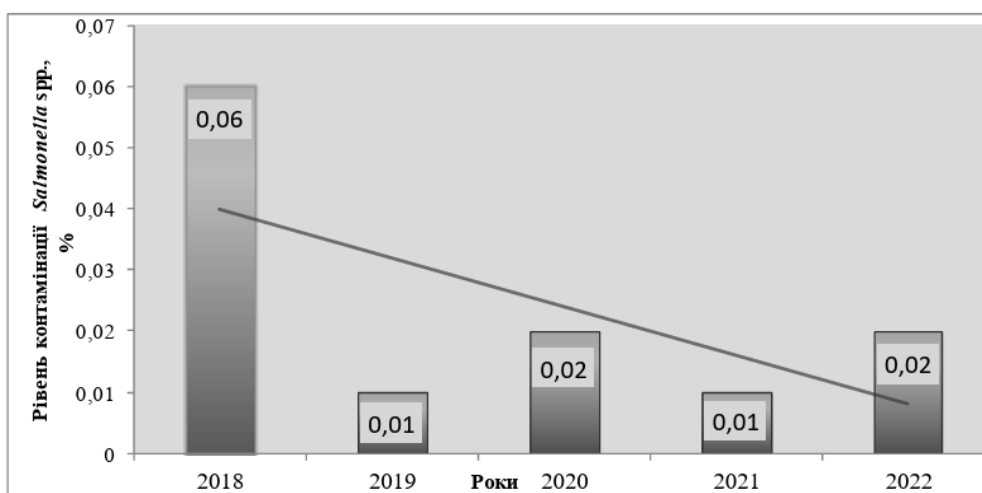


Рис.3.1. Динаміка рівня контамінації збудниками *Salmonella* spp. зразків дослідного матеріалу від птиці із господарств різних регіонів України за період 2018–2022 рр. (Чечет О.М., Мех Н.Я., Рубленко І.О. та ін., 2023)

Серед одержаних сальмонельозних ізолятів встановлено широкий видовий спектр циркулюючих сальмонел (17 сероварів) із домінуючим видом *Salmonella enteritidis*, виділеним у 27,9 % випадків із досліджуваних об'єктів. Сальмонели інших видів виділяли значно рідше: *Salmonella give* (9,0 %), *Salmonella infantis* (6,4 %), *Salmonella anatum* (2,2 %), *Salmonella derby*, *Salmonella kambole* і *Salmonella isangi* (по 1,7 %), *Salmonella typhimurium* (1,3

%), *Salmonella indiana*, *Salmonella essen*, *Salmonella eastbourne*, *Salmonella agone*, *Salmonella livingston*, *Salmonella dyugu*, *Salmonella portland* і *Salmonella aphii* (від 0,4 до 0,9 %) випадків відповідно серед інших виявлених видів сальмонел за період 2018–2022 рр.

Технологічний процес виробництва бактеріального антигену включає кілька послідовних етапів, починаючи з культивування штаму-продуцента в контрольованих умовах біореактора. Важливим аспектом є оптимізація середовища культивування та параметрів росту для досягнення максимального рівня експресії антигену.

Як предмет досліджень було обрано штами серовару *Salmonella enteritidis* SE-54, SE-65, SE-73, SE-81

Відновлення маточної культури бактерій роду *Salmonella* проводили на диференційно-діагностичному середовищі для уточнення чистоти музейного зразка. Музейні культури переносили в чашки Петрі з SS – агаром, культивувати впродовж 24 годин в термостаті при температурі від $37 \pm 0,5$ °C (рис.3.2).

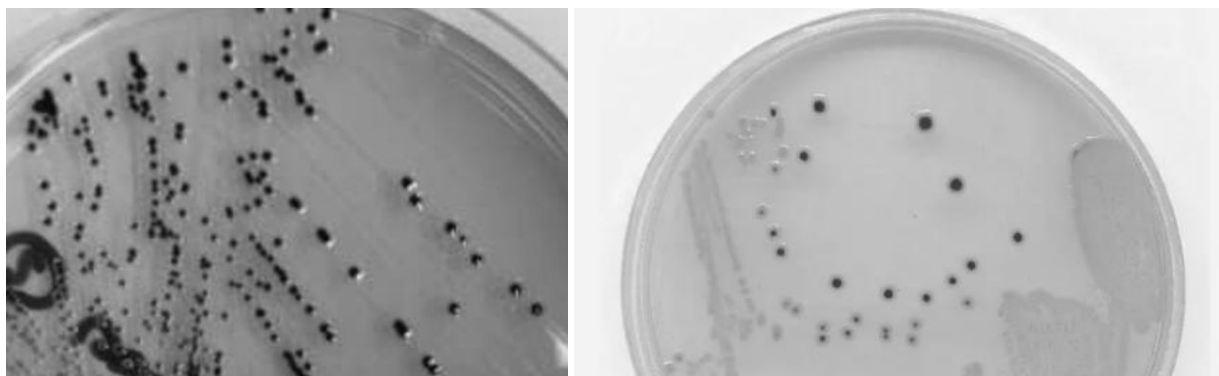


Рис.3.2. Аналіз чистоти музейної культури штами серовару *Enteritidis* SE-54 після 24 годин культивування на SS – агарі

Додавання солей жовчних кислот, цитрату натрію та діамантового зеленого служить для пригнічення грампозитивних, коліформних організмів та пригнічення роїння *Proteus* spp., водночас дозволяючи рости *Salmonella* spp. М'ясний екстракт, ферментований казеїн та тваринний матеріал забезпечують

джерела азоту, вуглецю та вітамінів, необхідних для росту бактерій. Тіосульфат та цитрат заліза дозволяють виявляти сірководень за утворенням колоній чорного кольору. Нейтральний червоний колір стає червоним за наявності кислого рН, що свідчить про те, що відбулася реакція.

Культурально-морфологічні ознаки штамів роду *Salmonella* spp. на SS-агарі описано в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Культурально-морфологічні ознаки штамів роду *Salmonella* spp. (тривалість інкубації 24 години)

Досліджу- ваний штам	Характер росту на SS- агарі	Ідентичність на SS-агарі	Характер росту на КЛД-агарі	Ідентичність на КЛД-агарі
SE-54	Круглі, гладенькі, напівпрозорі колонії, зона помутніння навколо колоній відсутня, 2-4 мм	Типова, лецетиназна активність відсутня	Червоно- рожеві колонії з вираженим великим чорним центром, пурпурно- червоний колір навколо колоній	Типова, виражена активність H ₂ S
SE-65	Гладенькі колонії, дрібні, без зони помутніння навколо колоній, 2-4 мм	Типова, лецетиназна активність відсутня	Рожеві колонії зі слабо вираженим невеликим чорним центром	Типова
SE-73	Гладенькі, напівпрозорі колонії, зона помутніння навколо колоній відсутня, 2-4 мм	Типова, лецетиназна активність відсутня	Колонії червоного кольору, з інтенсивним чорним центром, пурпурно- червоний колір навколо колоній	Типова, виражена активність H ₂ S
SE-81	Круглі, невеликого розміру колонії, лецетиназна активність відсутня 2-4 мм	Типова, лецетиназна активність відсутня	Рожеві, прозорі колонії з невеликим чорним центром	Типова, виражена активність H ₂ S

Проведена оцінка та контроль чистоти музейних штамів роду *Salmonella* за культивування на диференціально-діагностичному SS-агарі та показала відповідність штамів сальмонел серовару Enteritidis SE-54, SE-65, SE-73, SE-81. Про це свідчить відсутність лецитиназної активності на SS-агарі. Гладенькі колонії, виявлені у штамів сальмонел серовару Enteritidis SE-54, SE-65, SE-73, гарантують повний розвиток соматичного антигену "О", адже ця ознака надзвичайно важлива для ефективності композиції.

Наступним етапом було пересівання культури на КЛД-середовище (Ксилозо-Лізин-Дезоксихолатний агар). Агар XLD (ксилозо-лізин-дезоксихолатний агар) зроблено відповідно до ГОСТу згідно з ДСТУ EN ISO 6579-1:2022 Мікробіологія харчового ланцюга. Горизонтальний метод виявлення, підрахунку та серотипування *Salmonella*. Частина 1. Виявлення *Salmonella* spp. (EN ISO 6579-1:2017, IDT; ISO 6579-1:2017, IDT).

Це середовище рекомендоване для ідентифікації сальмонел. Феноловий червоний є індикатором рН. Дріжджовий екстракт служить джерелом вітамінів, особливо групи В. Хлорид натрію є джерелом необхідних електролітів і підтримує осмотичний баланс. Утилізація трьох ферментованих вуглеводів (ксилози, лактози та сахарози) з утворенням кислоти, при цьому червоний колір середовища дещо змінюється (рис. 3.3).

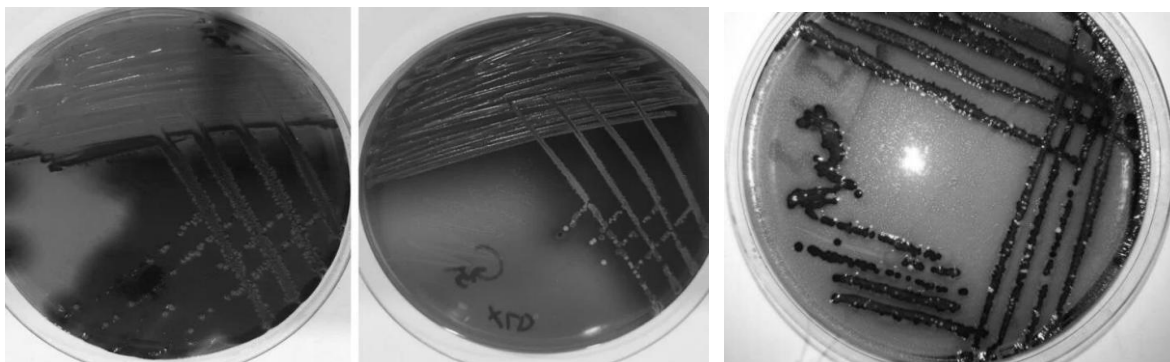


Рис.3.3. Ріст колоній сальмонел на середовищі КЛД

Тіосульфат натрію є реагентом для взаємодії з цитратом амонійного заліза – індикатором утворення сірководню в лужних умовах. Лізин додається

для диференціації патогенних сальмонел. Після утилізації ксилози, сальмонели ферментують лізин за допомогою лізин-декарбоксилази з залужуванням середовища. Бактерії, які декарбоксилують L-лізин до кадаверину, ідентифікуються за наявності пурпурно-червоного кольору навколо колоній в результаті підвищення рН.

Проведена оцінка та контроль чистоти музейних штамів роду *Salmonella* за культивування на диференціально-діагностичних середовищах SS-агарі та КЛД – середовищі показала відповідність штамів сальмонел серовару Enteritidis SE-54, SE-65, SE-73, SE-81. Про це свідчить відсутність лецитиназної активності на SS-агарі та утворення чорного центру у колоній на середовищі КЛД, який утворюється за утворення бактеріями H_2S . Диференціація досліджуваних штамів показала, що найбільш характерні ознаки були виявлені у штаму серовару Enteritidis SE-54.

Наступним кроком було напрацювання субкультури на селенітовому бульйоні (Лейфсона). Культурально-морфологічні ознаки штамів роду *Salmonella* spp. на КЛД-середовищі описано в таблиці 3.2.

Накопичення культури відбувається за рахунок пригнічення росту селенітом натрію сторонньої мікробіоти, що дозволяє сальмонелі розмножуватись до високих концентрацій.

Характерними ознаками росту бактерій роду *Salmonella* є дифузне помутніння середовища та утворення незначної кількості осаду. Найбільш інтенсивне дифузне помутніння, з утворенням класичного незначного осаду були виявлені у штаму серовару Enteritidis SE-54. Найкращі характеристики росту, висока адаптивна та проліферативна здатність штаму серовару Enteritidis SE-54 показали, що цей штам може бути обраним як оптимальний біологічний агент для подальших етапів оптимізації технології отримання бактеріальних антигенів.

Через 24 години штами роду *Salmonella*, перевіряли на ідентичність, готували мазки та мікроскопіювали.

Таблиця 3.2. Культурально-морфологічні ознаки штамів роду *Salmonella* spp. (тривалість інкубації 24 години)

Досліджу- ваний штам	Кількість колб з характерним ростом бактерій/ усього	Характер росту	Інтенсивність дифузного помутніння	Характер осаду
SE-54	5/5	Інтенсивне, рівномірне, дифузне помутніння	+++*	Незначний, дрібнозерни- стий
SE-65	5/5	Помірне дифузне помутніння	++	Незначний, пухкий
SE-73	3/5	Помірне дифузне помутніння, з слабким ростом в 2 колбах	++	Незначний, щільний
SE-81	5/5	Помірне дифузне помутніння	+	Слабкий, ледь помітний

*Примітка. Шкала інтенсивності росту: +++ – інтенсивне помутніння, що свідчить про високу концентрацію клітин, ++ – помірне помутніння, + – слабе помутніння

З метою розробки ефективних вітчизняних препаратів для профілактики сальмонельозу тварин, у дослідженнях Воїко О. et al. (2017) було отримано 30 ізолятів сальмонел з різних колекцій, зокрема виділених з епізоотичних осередків сальмонельозу. З цієї колекції було відібрано 6 штамів сальмонел як перспективні виробничі штами для створення вакцинних препаратів проти сальмонельозу та як контрольні для вивчення імуногенних властивостей вакцин. Воїко О. et al. (2017) встановлено, що досліджувані штами мали морфологічні характеристики, характерні для сальмонельозу, тинкторіальні, культуральні та біохімічні властивості та типові для кожного типу антигенної структури. Найвищу антигенну активність мали *S. typhimurium* ($1:256 \pm 154$ – $1:192 \pm 82$) та *S. dublin* ($1:192 \pm 51$), а найнижчу – *S. gallinarum* ($1:72 \pm 43$). Виявлено деякі закономірності у прояві вірулентних та антигенних

властивостей досліджуваних штамів сальмонельозу. Зокрема, було встановлено, що чим вища вірулентність штаму, тим вища його антигенна активність (Boiko O. et al., 2017).

3.2. Оптимізація середовища культивування та параметрів росту штаму серовару *Enteritidis* SE-54

Типові для штаму серовару *Enteritidis* SE-54, що вирости на середовищі SS-агарі, переносили в колби з м'ясо-пептонним бульйоном з гідролізатом Хоттингера, які інкубувати на радіальному шейкері при 70-90 об/хв. температурі $37 \pm 0,5$ °C впродовж 24 годин (табл.3.3).

Виявлено залежність між накопиченням біомаси штаму серовару *Enteritidis* SE-54 та вмістом амінного азоту у рідкому середовищі Хоттингера. Зниження концентрації амінного азоту до 1,0 г/л (середовище № 1) призводить до суттєвого пригнічення росту культури.

Встановлено зниження в 1,5 рази виходу вологої біомаси бактерій (12,0 порівняно із стандартом 18,7 г/л у середовищі №2).

Таблиця 3.3. Накопичення біомаси у штаму серовару *Enteritidis* SE-54 за культивування у рідкому середовищі Хоттингера

Варіант досліджу	Уміст амінного азоту, г/л	Вихід вологої біомаси після центрифугування, г/л	Концентрація бактерій, КУО/мл
Середовище № 1	1,0	$12,0 \pm 0,5$	$1,9 \times 10^{11}$
Середовище № 2 (стандарт)	1,2	$18,7 \pm 1,2$	$2,4 \times 10^{11}$
Середовище № 3	1,4	$23,8 \pm 1,1$	$3,6 \times 10^{11}$
Середовище № 4	1,6	$25,8 \pm 0,8$	$3,8 \times 10^{11}$

Водночас підвищення вмісту амінного азоту до 1,4 г/л (середовище № 3) забезпечило інтенсивний ріст бактерій, що забезпечило отримати 23,8 г/л біомаси клітин та $3,6 \times 10^{11}$ КУО/мл концентрацію клітин (на стандартному середовищі концентрація клітин становила $2,4 \times 10^{11}$ КУО/мл). Подальше збільшення концентрації амінного азоту до 1,6 г/л (середовище № 4) показало незначне збільшення біомаси (до 25,8 г/л) та титру клітин ($3,8 \times 10^{11}$ КУО/мл). Цей приріст не був статистично достовірним і з точки зору економічної ефективності не є оптимальним за рахунок вартості складу живильних середовищ без істотного збільшення виходу біомаси.

Протоколи роботи з штамами сероварів роду *Salmonella* вимагають дослідження різних поживних середовищ. Gorski, L., et al. (2024) встановили ефективність місцевих штамів з використанням таких середовищ, як: BPW – буферна пептонна вода; IMS – середовище з імуномагнітним розділенням; RVS – соєве пептонове середовище Раппапорта-Васіліадіса; TT – тетратіонатний бульйон; BGS – середовище з сульфадіазином та діамантовим зеленим; DMLIA – подвійно модифікований лізиновий залізний агар; XLD – середовище з ксилози, лізину, дезоксихолату. Аналіз CRISPR-SeroSeq виявив складність сероварів, присутніх у збагачених культурах *Salmonella* -позитивних, а також відмінності в бульйонах TT та RVS. З огляду на різноманітність різних середовищ, доступних для збагачення та ізоляції *Salmonella*, існують відмінності у відновленні сероварів, зокрема серед середовищ для висівання (BGS, XLD та DMLIA), що використовувалися після селективного збагачення в RVS, TT та з етапом відновлення магнітними кульками (IMS). Cui та ін. (2006) показали, що комбінація RVS-DMLIA та RVS-BGS дала більше колоній *Salmonella*, ніж TT-DMLIA або TT-BGS. Obe та ін. (2021) встановили, що агари BGS та XLT-4 були ефективнішими, ніж агар Hektoen Enteric.

Підбір оптимальних середовищ та умов культивування *Salmonella spp.* є актуальним і питання.

Neyaz, L.A., Alghamdi, H.S., Alghashmari, R.M. et al. (2024) запропонували чотири окремі фази традиційного виділення та дослідження *Salmonella* spp., такі як:

(1) попереднє накопичення на неселективному середовищі для реанімації пошкоджених клітин та розмноження цільових та конкуруючих мікроорганізмів;

(2) селективне збагачення *Salmonella* spp. у селективному середовищі для пригнічення конкуруючих організмів;

(3) виділення цільового організму через селективне середовище, яке обмежує ріст інших бактерій для отримання ймовірних ізолятів, та

(4) серологічні та біохімічні підтверджувальні тести для визначення серовару *Salmonella* (рис. 3.4).

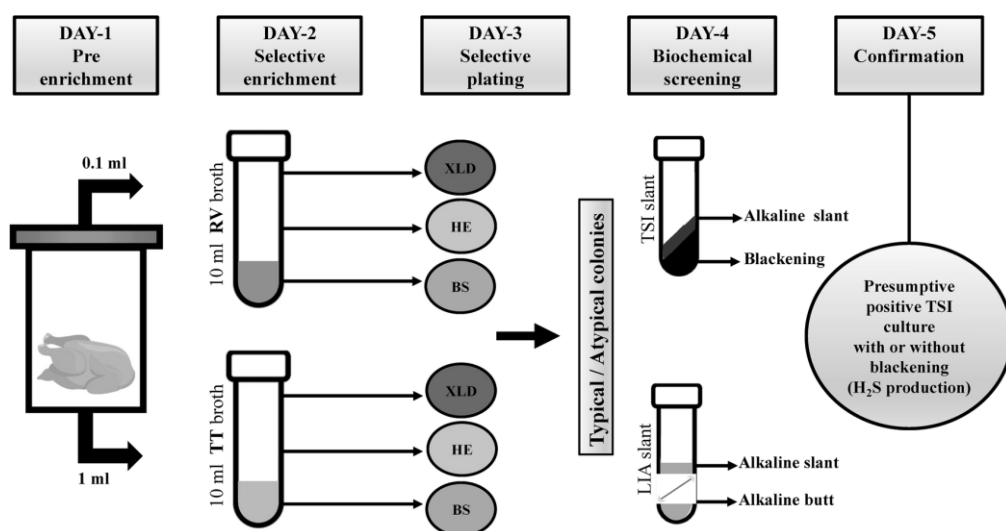


Рис. 3.4. Діаграма, що описує стандартну процедуру Управління з контролю за продуктами харчування та лікарськими засобами США, Бактеріологічного аналітичного посібника (FDA-BAM) для виділення *Salmonella* spp. з харчових продуктів. Збагачення в буферній пептонній воді, бульйоні RV Rappaport-Vassiliadis, тетратіонатному бульйоні TT, ксилозно-лізиндезоксихолатному агарі XLD, кишковому агарі HE Hektoen, вісмут-сульфітному агарі BS, потрійному цукровому залізо-агарі TSI, лізин-залізо-агарі LIA (Neyaz, L.A., Alghamdi, H.S., Alghashmari, R.M. et al. (2024))

Описані процедури передбачають:

День 1— Попереднє накопичення 0.1 ml / 1 ml — 0,1 мл / 1 мл (об'єми зразків).

День 2 — Селективне накопичення 10 мл бульйону Раппапорта-ВАССІЛАДІСА (RV-бульйон), 10 мл тетратіонатного бульйону (ТТ-бульйон).

День 3— Селективний посів на чашки / диференційні середовища):

XLD — Ксилозо-лізин-дезоксихолатний агар (XLD-агар)., HE — Агар Гектоен (HE-агар), BS — Вісмут-сульфіт агар (BS-агар), визначення Типові / атипові колонії.

День 4— Біохімічний скринінг, середовища: трицукровий залізистий скошений агар, лужний скошений край (почервоніння), почорніння (утворення H_2S), лізин-залізистий скошений агар (LIA-агар), лужний скошений край, лужне стовпчик (основа).

День 5— Підтвердження — Імовірно позитивна культура на TSI з почорнінням або без нього (продукування сірководню H_2S).

Одними з етапів протоколів виділення сальмонел згідно Gorski, L., et al. (2024) є:

1. Субкультивування змивів уражених органів птахів у селективних рідких середовищах: тетратіонатний бульйон (ТТ) та соєво- пептонний бульйон Раппапорта-Васіладіса (RVS), та інкубування при 42 °C для вторинного селективного накопичення.

2. З цих вторинних культур висівають штрихами на різноманітні диференціальні селективні середовища, включаючи агар з блискучим зеленим сульфатом (BGS), агар з подвійним модифікованим лізиновим залізом (DMLIA), агар з ксилозою та лізиндезоксихолату (XLD) та/або агар з ксилозою та лізиновим тергітолом-4 (XLT-4), які інкубують протягом 18–24 годин при 35 °C.

3. Після інкубації колонії сальмонели відбирають для підтвердження за допомогою молекулярних, серологічних та/або біохімічних тестів (Служба

інспекції безпеки харчових продуктів Міністерства сільського господарства США, 2023).

4. Проводиться секвенування повного геному (WGS) ізоляту(ів) *Salmonella*, а серовар визначається біоінформатично (Lou, L., Zhang et al., 2019).

З метою збереження економічної ефективності запропонована схема культивування штаму серовару *Enteritidis* SE-54 як оптимального біологічного агенту у рідкому середовищі Хоттингера з підвищеним вмістом амінного азоту до 1,4 г/л може бути обране для подальших етапів технології отримання бактеріальних антигенів.

ВИСНОВКИ

1. Проведена оцінка та контроль чистоти музейних штамів роду *Salmonella* за культивування на диференціально-діагностичних середовищах SS-агарі та КЛД – середовищі показала відповідність штамів сальмонел серовару Enteritidis SE-54, SE-65, SE-73, SE-81. Про це свідчить відсутність лецитиназної активності на SS-агарі та утворення чорного центру у колоній на середовищі КЛД, який утворюється за утворення бактеріями H_2S .

2. Диференціація досліджуваних штамів показала, що найбільш характерні ознаки були виявлені у штаму серовару Enteritidis SE-54. Найбільш інтенсивне дифузне помутніння, з утворенням класичного незначного осаду при накопиченні культури на Селенітовому бульйоні (Лейфсона) були виявлені у штаму серовару Enteritidis SE-54.

3. Найкращі характеристики росту, висока адаптивна та проліферативна здатність штаму серовару Enteritidis SE-54 показали, що цей штам може бути обраним як оптимальний біологічний агент для подальших етапів оптимізації технології отримання бактеріальних антигенів.

4. У рідкому середовищі Хоттингера виявлено зниження в 1,5 рази виходу біомаси штаму серовару Enteritidis SE-54 за концентрації амінного азоту 1,0 г/л (середовище № 1) (12,0 порівняно із стандартом 18,7 г/л у середовищі №2), що свідчить про суттєве пригнічення росту культури. Водночас підвищення вмісту амінного азоту до 1,4 г/л (середовище № 3) забезпечило інтенсивний ріст бактерій, що забезпечило отримати 23,8 г/л біомаси клітин та $3,6 \times 10^{11}$ КУО/мл концентрацію клітин (на стандартному середовищі концентрація клітин становила $2,4 \times 10^{11}$ КУО/мл).

5. Збільшення концентрації амінного азоту до 1,6 г/л (середовище № 4) показало незначне збільшення біомаси (до 25,8 г/л) та титру клітин ($3,8 \times 10^{11}$ КУО/мл). Цей приріст не був статистично достовірним і з точки зору економічної ефективності не є оптимальним за рахунок вартості складу живильних середовищ без істотного збільшення виходу біомаси.

6. Таким чином, культивування штаму серовару Enteritidis SE-54 як оптимального біологічного агенту у рідкому середовищі Хоттингера з підвищеним вмістом амінного азоту до 1,4 г/л може бути обране для подальших етапів технології отримання бактеріальних антигенів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Balasubramanian R., Im J., Lee J.S., Jeon H.J., Mogeni O.D., Kim J.H., Rakotozandrindrainy R., Baker S., Marks F. The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal *Salmonella* infections. *Hum. Vaccines Immunother.* 2019;15:1421–1426. doi: 10.1080/21645515.2018.1504717.
2. Baptista D., Borsoi A., Reischak D., Nascimento A., Montesino L., Camillo S., Abreu D., Pereira V. *Salmonella* Serovars Isolated from Poultry Breeding Flocks under the Brazilian Official Control Programme Between 2016 and 2018. *Braz. J. Poult. Sci.* 2023;25:1. doi: 10.1590/1806-9061-2022-1646.
3. Barat S, Willer Y, Rizos K, Claudi B, Mazé A, Schemmer AK, Kirchhoff D, Schmidt A, Burton N, Bumann D. Immunity to intracellular *Salmonella* depends on surface-associated antigens. *PLoS Pathog.* 2012. 8(10):e1002966. doi: 10.1371/journal.ppat.1002966.
4. Boiko, Oksana & Sen, O.M. & Boiko, P.K. & Kurtiak, B.M. & Pundiak, T.O. & Sobko, G.V. Характеристика морфологічних ознак та фізіологічних властивостей штамів сальмонел, ізольованих від птиці і телят. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies.* 19. 129-135. 10.15421/nvlvet7826.
5. Branchu P., Bawn M., Kingsley R.A. Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infect. Immun.* 2017. 2018;86:e00079-18. doi: 10.1128/IAI.00079-18.
6. Center for Disease Control and Prevention (CDC) Drug-Resistant Nontyphoidal *Salmonella*. [(accessed on 12 July 2023)]; Available online: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/nt-salmonella-508.pdf>.
7. Center for Disease Control and Prevention (CDC) *Salmonella*. [(accessed on 11 July 2023)]; Available online: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html#:~:text=CDC%20estimates%20Salmonella%20bacteria%20cause,%2C%20fever%2C%20and%20stomach%20cramps>.

8. Cheng R.A., Embracing Diversity: Differences in Virulence Mechanisms, Disease Severity, and Host Adaptations Contribute to the Success of Nontyphoidal Salmonella as a Foodborne Pathogen. *Front. Microbiol.* 2019. 10:1368. doi: 10.3389/fmicb.2019.01368.
9. Cui S., Zheng J. , J. Meng. An improved method for rapid isolation of Salmonella against Proteus in chicken carcasses. *J. Food Saf.* 2006. 26. pp. 49-61. <https://doi-org.nal.idm.oclc.org/10.1111/j.1745-4565.2005.00032.x>
10. Gordon M.A., Graham S.M., Walsh A.L., Wilson L., Phiri A., Molyneux E., Zijlstra E.E., Heyderman R.S., Hart C.A., Molyneux M.E. Epidemics of invasive Salmonella enterica serovar enteritidis and S. enterica Seroovar typhimurium infection associated with multidrug resistance among adults and children in Malawi. *Clin. Infect. Dis.* 2008. 46:963–969. doi: 10.1086/529146.
11. Gorski, L., Shariat, N. W., Richards, A. K., Siceloff, A. T., Aviles Noriega, A., & Harhay, D. M. Growth assessment of Salmonella enterica multi-serovar populations in poultry rinsates with commonly used enrichment and plating media. *Food microbiology.* 2024. 119, 104431. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104431>
12. Horlock, A. (2022). Innate immunity and metabolism in the bovine ovarian follicle. 10.23889/SUthesis.59754.
13. URL:<https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BC%D0%BE%D0%BD%D0%B5%D0%BB%D0%B0>
14. Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., Fields, P. I., & Weill, F. X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in microbiology.* 2014. 165(7), 526–530. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>
15. Khan A. Effect of synbiotic on intestinal histomorphometry and growth rate in quails, experimentally infected with field strain of Salmonella Gallinarum. *Pakistan Journal of Science.* 2023. Vol. 74, No. 2. DOI: <https://doi.org/10.57041/pjs.v74i2.775>

16. Lamichhane, B., Mawad, A. M. M., Saleh, M., Kelley, W. G., Harrington, P. J., 2nd, Lovestad, C. W., Amezcua, J., Sarhan, M. M., El Zowalaty, M. E., Ramadan, H., Morgan, M., & Helmy, Y. A. Salmonellosis: An Overview of Epidemiology, Pathogenesis, and Innovative Approaches to Mitigate the Antimicrobial Resistant Infections. *Antibiotics*. 2024. 13(1), 76. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010076>
17. Lanzilao L., Stefanetti G., Saul A., MacLennan CA., Micoli F., Rondini S. Strain Selection for Generation of O-Antigen-Based Glycoconjugate Vaccines against Invasive Nontyphoidal *Salmonella* Disease. *PLoS ONE*. 2015. 10(10): e0139847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139847>
18. Meloni, E., Colucci, A. M., Micoli, F., Sollai, L., Gavini, M., Saul, A., Di Cioccio, V., & MacLennan, C. A. Simplified low-cost production of O-antigen from *Salmonella* Typhimurium Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA). *Journal of biotechnology*. 2015. 198, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.020>
19. Miletic S., Goessweiner-Mohr N., Marlovits T.C. The structure of the type III secretion system needle complex. *Curr. Top Microbiol. Immunol*. 2020. 427:67–90. doi: 10.1007/82_2019_178.
20. Milligan R., Paul M., Richardson M., Neuberger A. Vaccines for preventing typhoid fever. *Cochrane Database Syst. Rev*. 2018. 5: Cd001261. doi: 10.1002/14651858.CD001261.pub4.
21. Neyaz, L.A., Alghamdi, H.S., Alghashmari, R.M. et al. A comprehensive review on the current status of culture media for routine standardized isolation of *Salmonella* and *Shigella* spp. from contaminated food. *J.Umm Al-Qura Univ. Appl. Sci*. 2024. <https://doi.org/10.1007/s43994-024-00205-2>
22. Obe T., Berrang M.E., Cox N.A., House S.L., Shariat N.W. Comparison of selective enrichment and plating media for *Salmonella* isolation from broiler carcasses. *J. Food Saf*. 2021. 41. e12928, 10.1111/jfs.12928

23. Olnood C.G., Beski S.S., Choct M., Iji P.A. Use of *Lactobacillus johnsonii* in broilers challenged with *Salmonella* sofia. *Anim. Nutr.* 2015. 1:203–212. doi: 10.1016/j.aninu.2015.07.001.
24. Porwollik S., Santiviago C., Cheng P., Florea L., McClelland M. Differences in gene content between *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. *J. Bacteriol.* 2005. 187:6545–6555. doi: 10.1128/JB.187.18.6545-6555.2005.
25. Rabsch W., Tschäpe H., Bäuml A.J. Non-typhoidal salmonellosis: Emerging problems. *Microbes Infect.* 2001. 3:237–247. doi: 10.1016/S1286-4579(01)01375-2.
26. Sania T., Abdul S., Muhammad H., Areeb A., Ayesha M., Shehroz A., Abdelslam Masoud Abobakr A. *Salmonella* in Poultry; an Overview. *Int. J. Multidiscip. Sci. Arts.* 2022. 1:80–84. doi: 10.47709/ijmdsa.v1i1.1706.
27. Saraf S., Jafra B.S., Ray P., Rawat A., Verma S. Multidrug-Resistant Nontyphoidal *Salmonella* Associated with Invasive Disease in an Immunocompetent Child. *Indian J. Pediatr.* 2021. 88:1266. doi: 10.1007/s12098-021-03923-1.
28. Sears K.T., Galen J.E., Tennant S.M. Advances in the development of *Salmonella*-based vaccine strategies for protection against Salmonellosis in humans. *J. Appl. Microbiol.* 2021. 131:2640–2658. doi: 10.1111/jam.15055.
29. Tie K., Yuan Y., Yan S., Yu X., Zhang Q., Xu H., Zhang Y., Gu J., Sun C., Lei L., et al. Isolation and identification of *Salmonella pullorum* bacteriophage YSP2 and its use as a therapy for chicken diarrhea. *Virus Genes.* 2018. 54:446–456. doi: 10.1007/s11262-018-1549-0.
30. Velasquez C.G., Macklin K.S., Kumar S., Bailey M., Ebner P.E., Oliver H.F., Martin-Gonzalez F.S., Singh M. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolated from poultry farms in southeastern United States. *Poult. Sci.* 2018. 97:2144–2152. doi: 10.3382/ps/pex449.
31. Lou, L., Zhang, P., Piao, R., & Wang, Y. *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2019. 9, 270. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00270>

32. ДСТУ EN ISO 6579-1:2022 Мікробіологія харчового ланцюга. Горизонтальний метод виявлення, підрахунку та серотипування *Salmonella*. Частина 1. Виявлення *Salmonella* spp (EN ISO 6579-1:2017, IDT; ISO 6579-1:2017, IDT).

33. Рубленко Н. М. Ідентифікація бактерій роду *Salmonella* та сероварів *Enteritidis* і *Typhimurium* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ). *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2020. № 1. С. 21–31.

34. Рубленко Н. М. Молекулярно-генетичні механізми виживання і резистентності сальмонел. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2018. № 2. С. 6–12.

35. Рубленко Н. М., Дерябін О. М., Головка А. М., Пінчук Н. Г. Виявлення та аналіз поширення генів помірних бактеріофагів у штаммах *Salmonella enterica*. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2016. № 1. С. 95–102.

36. Чечет О.М., Мех Н.Я., Рубленко І.О., Горбатюк О.І., Герілович А.П., Мусієць І.В., Бучковська Г.А., Курята Н.В., Ординська Д.О., Шалімова Л.О., Баланчук Л.В., Тогачинська Л.В., Кучинський М.В. Частота виявлення бактерій роду *Salmonella* в патологічному матеріалі, сировині, продукції від птиці та довкіллі птахогосподарств України за період 2018–2022 рр. *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 2023. № 2. С. 124–134. Doi: 10.33245/2310-4902-2023-184-2-124-134

37. Фаріонік Т.В., Бондар М.М. Методичні вказівки з дисципліни «Технічна мікробіологія» до лабораторних занять. Вінниця: ОЦ ВНАУ, 2018. 49 с.