

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**ВИГОВСЬКА ЛІЛЯ МИКОЛАЇВНА**

УДК 57.083.1:616.99

**БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЗБУДНИКІВ ХАРЧОВИХ ЗООНОЗІВ  
ТА РОЗРОБКА ЗАСОБІВ ІНДИКАЦІЇ**

16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,  
інфекційні хвороби та імунологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора ветеринарних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

**Науковий консультант** доктор ветеринарних наук, професор,  
член-кореспондент НААН  
**Ушкалов Валерій Олександрович,**  
Національний університет біоресурсів  
і природокористування України,  
директор Української лабораторії якості  
і безпеки продукції агропромислового комплексу

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук, професор,  
член-кореспондент НААН  
**Герілович Антон Павлович,**  
Національний науковий центр  
«Інститут експериментальної  
і клінічної ветеринарної медицини» НААН,  
заступник директора з наукової роботи

доктор ветеринарних наук, професор  
**Галатюк Олександр Євстафійович,**  
Житомирський національний  
агроекологічний університет,  
завідувач кафедри мікробіології,  
фармакології та епізоотології

доктор ветеринарних наук,  
старший науковий співробітник  
**Уховський Віталій Вікторович,**  
Інститут ветеринарної медицини НААН,  
завідувач лабораторії лептоспірозу  
з музеєм мікроорганізмів

Захист відбудеться «14» березня 2019 року о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «13» лютого 2019 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Н. Г. Грушанська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** На початку XXI століття інфекційні захворювання залишаються однією з основних причин летальності у світі. В економічно-розвинених країнах згідно рекомендацій Продовольчої та сільсько-господарської організації ООН (Food and Agriculture Organization, FAO) та Всесвітньої організації охорони здоров'я (World Health Organization, WHO) було вдосконалено системи контролю за продуктами харчування, що несуть ризик зараження збудниками хвороб із харчовим шляхом передачі (Сальмонельоз, Іерсиніоз, Кампілобактеріоз, Лістеріоз, Ешерихіоз).

Дослідження останніх десятиліть у галузі мікробіології значно доповнили уявлення про збудників захворювань, форми їх існування у природі, їх етіологічну роль в епізоотичних (епідемічних) та інфекційних процесах (Сомова Л. М. та ін., 2006; Dell'Era S. et al., 2009; Christelle G., 2010). У зв'язку з цим, наразі ведеться активне та всебічне дослідження етіології, патогенезу, мікробіологічної діагностики, епідеміології, терапії та профілактики захворювань, пов'язаних із незвичайними інфекційними агентами. За дослідженнями Caro A. et al. (1999), Гинцбург А. Л. та ін. (1999), Markova N. et al. (2010), Гаврилова Л. Б. та ін. (2011), *S-R*-дисоціанти, *L*-варіанти збудників відіграють важливу роль у патології, епідеміології, імунології багатьох інфекційних захворювань, у тому числі й особливо небезпечних. Про поширеність у довкіллі збудників зоонозів, які втрачають здатність до вегетації *in vitro* та відповідальні за несподівані спалахи деяких інфекцій вказують ряд дослідників, зокрема R. R. Colwell et al. (1985), Ю. М. Романова та ін. (1998), А. А. Бывалов та ін. (2008).

Серед індукторів виникнення модифікованих форм збудників інфекційних захворювань найбільш актуальним на сьогодні є неконтрольоване застосування антибактеріальних препаратів (Pruden A. et al., 2013; Сулотницький М. В., 2011; Головка А. М. та ін., 2014; Коцюмбас І. Я. та ін., 2014; Макаренко В. Д. та ін., 2017; Данчук В. В. та ін., 2017). За дослідженнями М. В. Косенка та ін. (2007), Р. М. Bennett (2008), Ю. І. Феценка та ін. (2010), A. Dalhoff (2012), K. Mc Nulty et al. (2016), упродовж двох останніх десятиліть значно збільшилася антимікробна резистентність багатьох збудників.

Від добре вивчених форм збудників зоонозів модифіковані форми відрізняються більш агресивними властивостями, здатністю викликати періодичні ендемічні спалахи захворювань, хронічні та латентні інфекційні процеси, тривале носійство, складністю у терапії та діагностиці. Це призводить до високого рівня хронічних ускладнень, летальних випадків, істотно сприяє поширенню інфекції (Phol P. et al., 1991; Domingue G. J., Woody H. V., 1997). Про необхідність постійного удосконалення стратегії контролю за епізоотичним процесом, удосконалення існуючих і розроблення нових способів та засобів діагностики і лікування вказують ряд дослідників, зокрема Е. М. Егорова (2004), M. W. Schmid et al. (2005), Н. Р. Ефимочкина (2010), О. Н. Софронова (2012).

Еволюція інфекційних хвороб диктує необхідність подальшого вивчення особливостей біологічних властивостей збудників (морфологічних, ферментативних, молекулярно-генетичних, патогенних, чутливості до антибактеріальних засобів), пошуку нових альтернативних препаратів для їх лікування та профілактики, також актуальним є удосконалення існуючих і розроблення нових способів та засобів індикації та диференційної діагностики мікробіологічним та молекулярно-генетичними методами.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертація є складовою частиною науково-дослідних робіт Української лабораторії якості та безпеки продукції агропромислового комплексу Національного університету біоресурсів і природокористування України: «Моніторинг якості біоресурсів та продукції агропромислового комплексу для забезпечення продовольчої та екологічної безпеки України» (2015–2018 рр.); «Науково-експериментальне обґрунтування моніторингу антибіотико-резистентності у мікроорганізмів – контамінантів продукції АПК в межах концепції «Глобальне здоров'я» (номер державної реєстрації 0117U000511, 2017–2018 рр.); «Науково-експериментальне обґрунтування молекулярно-генетичного скринінгу збудників, які передаються з продуктами харчування (*Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*)» (номер державної реєстрації 0118U002547, 2018–2020 рр.) та Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ): «Підтримання колекції штамів мікроорганізмів, що використовуються при виробництві і контролюванні якості ветеринарних препаратів» (номери державної реєстрації: 0109U006747, 2009 р.; 0110U006535, 2010 р.); «Колекція патогенних для тварин штамів мікроорганізмів Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів» (номери державної реєстрації: 0110U006712, 2010 р.; 0111U007675, 2011 р.; 0112U007184, 2012 р.); «Вивчення біологічних властивостей інноваційних штамів мікроорганізмів» (номер державної реєстрації 0113U007408, 2013 р.); «Розроблення системи контролю харчових токсикоінфекцій, зумовлених кампілобактеріями» (номер державної реєстрації 0110U00696, 2011–2013 рр.).

**Мета та завдання дослідження.** Мета дослідження – дослідити біологічні властивості мікроорганізмів – збудників актуальних харчових зоонозів та розробити засоби їх індикації.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

– дослідити біологічні властивості *Salmonella spp.*, визначити особливості R-форм, L-форм протопластного та сферопластного типів та розробити засоби індикації *Salmonella spp.* на основі реакції аглютинації та полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі;

– дослідити біологічні властивості *Yersinia spp.*, встановити їх особливості за умови S-R-дисоціації; розробити та визначити ефективність засобу для індикації ДНК *Yersinia enterocolitica* методом полімеразної ланцюгової реакції;

– дослідити біологічні властивості *Pasteurella multocida* та визначити їх особливості за умови S-R-дисоціації;

- дослідити біологічні властивості *Listeria spp.*, встановити їх особливості в L-формах протопластного та сферопластного типів;
- розробити та визначити ефективність засобів для індикації ДНК *Listeria spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції та ДНК *Listeria monocytogenes* методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі;
- вивчити біологічні властивості термофільних кампілобактерій, розробити засоби для їх культивування та підтримання;
- розробити засоби для індикації ДНК бактерій роду *Campylobacter* методом полімеразної ланцюгової реакції та встановити його ефективність;
- вивчити біологічні властивості штамів *E. coli* та розробити спосіб індикації шиготоксинутворюючих (*stx1/stx2*) *Escherichia coli* методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі;
- вивчити поширення ентеробактерій із набутою множинною резистентністю до антибіотиків в об'єктах ветеринарного нагляду у галузі птахівництва;
- вивчити особливості впливу наночастинок металів на культуральні властивості патогенних мікроорганізмів.

*Об'єкт дослідження* – бактерії – збудники актуальних харчових зоонозів.

*Предмет дослідження* – біологічні властивості збудників актуальних харчових зоонозів та особливості їх індикації.

**Методи дослідження:** бактеріологічні (визначення культурально-морфологічних, ферментативних, гемолітичних, антигенних властивостей, визначення чутливості до антибіотиків); серологічні (реакція аглютинації); біологічні (біологічна проба); молекулярно-біологічні (полімеразна ланцюгова реакція); статистичні (обробка результатів досліджень).

**Наукова новизна одержаних результатів.** У дисертації досліджено біологічні властивості бактерій – актуальних харчових зоонозів, встановлено особливості їх внутрішньородової диференціації, особливості фенотипових проявів біологічних властивостей за умови модифікацій різних типів із застосуванням бактеріологічних, серологічних, біологічних, молекулярно-біологічних методів досліджень.

Охарактеризовано видові ознаки чутливості до пеніцилінів, цефалоспоринів, карбопенемів, аміноглікозидів, макролідів, лінкозамідів, тетрациклінів, хінолонів, нітрофуранів *Salmonella spp.* (серогруп *C1, B, D*), *Listeria spp.* (*L. monocytogenes, L. ivanovii, L. seeligeri, L. innocua, L. grayi, L. murrayi, L. welshimeri*), *Yersinia spp.* (*Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis*), *P. multocida, Campylobacter spp.* (*C. jejuni, C. coli, C. lari*). Досліджено й охарактеризовано зміни чутливості до антибактеріальних засобів, що відбуваються за різних типів модифікацій грампозитивних та грамнегативних бактерій – збудників зоонозів *in vitro* та *in vivo*; охарактеризовано біологічні властивості ізолятів *Salmonella spp.* та *E. coli* з набутою множинною резистентністю до антибіотиків.

Встановлено, що прояви змін біологічних властивостей (культурально-морфологічних, ферментативних, антигенних, патогенних, чутливість до антибактеріальних препаратів) у бактерій у разі модифікаційних змін

характеризуються загальними біологічними закономірностями, які відбуваються в певній послідовності, залежать від виду мікроорганізму і типу мінливості (*S-R*-дисоціації, *L*-трансформації, втраті здатності до вегетації *in vitro*). Описані зміни в культурально-морфологічних, ферментативних, антигенних, патогенних властивостях грампозитивних та грамнегативних бактерій – актуальних харчових зоонозів за різних видів модифікацій: у *Salmonella spp.* – за умови *S-R*-дисоціації, *L*-трансформації сферопластного та протопластного типів; у *Listeria spp.* – за умови *L*-трансформації сферопластного та протопластного типів; у *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *P. multocida* – за умови *S-R*-дисоціації; у *Campylobacter spp.* – за втрати здатності до вегетації *in vitro*.

Експериментально обґрунтовано доцільність проведення комплексних досліджень із застосуванням мікробіологічних та молекулярно-біологічних методів для виявлення *R*-форм, *L*-форм сферопластного типу, форм, які втратили здатність до вегетації *in vitro*.

Досліджено вплив наночастинок Ауруму (10 нм, 20, 30, 45 нм) та Бісмуту (40 нм) на ростові властивості мікроорганізмів; встановлено, що стимуляція або інгібіція ростових властивостей бактерій залежать від розміру наночастинок, їх концентрації та виду мікроорганізму (*E. coli*, *Bacillus anthracis*, *Listeria spp.*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Y. enterocolitica*).

Наукову новизну результатів досліджень підтверджено деклараційними патентами на корисні моделі: «Засіб для диференційної діагностики лістеріозу бактеріологічним методом та для оцінки якості поживних середовищ для культивування *Listeria spp.*»; «Спосіб виявлення ДНК *Yersinia enterocolitica* за допомогою напівгніздового методу полімеразної ланцюгової реакції»; «Спосіб індикації *Salmonella spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі»; «Спосіб ідентифікації шиготоксинутворюючих (*stx1/stx2*) *Escherichia coli* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі».

**Практичне значення одержаних результатів.** Одержані результати доповнюють і поглиблюють сучасні знання про культурально-морфологічні, ферментативні, антигенні, патогенні властивості збудників інфекційних захворювань бактеріальної етіології, а також за умови модифікаційних змін на різних етапах модифікації, що сприятиме розробленню ефективних засобів діагностики актуальних харчових зоонозів.

Відомості про чутливість до антибіотиків мікроорганізмів різних видів як за умови норми, так і за дисоціації є інструментом для широкого застосування у терапевтичній практиці та під час розроблення засобів діагностики і профілактики бактеріальних інфекцій.

На підставі проведеного вивчення біологічних властивостей ізолятів мікроорганізмів роду *Yersinia spp.*, *Listeria spp.*, *Campylobacter spp.* та їх порівняння з референтними штамами (колекції АТСС, Бельгійської колекції культур) розроблено паспорти на штами (*L. monocytogenes* 4b (П), *L. monocytogenes* 1/2в (П), *L. monocytogenes* 1/2 a (П), *L. ivanovii* 0811i, *L. seeligeri* 0811s, *L. welshimeri* 0313w, *L. grayi* 0811g, *L. murrayi* 0811m, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Campylobacter jejuni* 3С - 18/12) та

проведено їх депонування, що дозволяє використовувати ці штами для потреб лабораторної діагностики і біотехнології. Штами *Listeria spp.* використано у складі набору для диференціації лістерій.

Експериментально обґрунтовано використання депонованих штамів *Yersinia spp.*, *Listeria spp.*, *Campylobacter spp.* у якості позитивних контролів під час розроблення та використання полімеразної ланцюгової реакції – тест-систем для індикації та внутрішньородової диференціації збудників лістеріозу, ієрсиніозу та кампілобактеріозу; штами *P. multocida* використано під час оцінки специфічності наборів для виявлення ДНК ентеробактерій.

Результати досліджень стали науковим підґрунтям для державної реєстрації в Україні: 1) Набору антигенів для діагностики сальмонельозів тварин, РП «ВВ-00189-06-10» від 24.03.2010 р.; 2) Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій виду *Yersinia enterocolitica* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Yersinia enterocolitica* – ПЛР-Тест», РП «ВВ-00678-06-14» від 03.04.2014 р.; 3) Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій виду *Campylobacter spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Campylobacter spp.* – ПЛР-Тест», РП «ВВ-00687-06-14» від 01.07.2014 р.; 4) Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Listeria spp.* – ПЛР-Тест», РП «ВВ-00643-06-13» від 11.04.2013 р.; 5) Набору тест-штамів *Listeria spp.* для проведення САМР-test та контролю якості поживних середовищ, РП «ВВ-00544-06-13» від 11.04.2013 р.

Результати наукових досліджень, отримані під час виконання дисертації, лягли в основу методичних та науково-практичних рекомендацій: «Перелік показників якості для ветеринарних імунобіологічних засобів» (затверджено Науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України, протокол № 1 від 23 грудня 2010 р.); «Методичні рекомендації з лабораторної діагностики кишкового ієрсиніозу тварин, виявлення *Yersinia enterocolitica* у харчових продуктах, кормах для тварин та об'єктах довкілля» (затверджено Науково-технічною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби Міністерства аграрної політики України, протокол № 1 від 21 грудня 2012 р.); «Термофільні кампілобактерії: методи виявлення, диференціація, антибіотикорезистентність та некультивуємі форми» (затверджено вченою радою Української лабораторії якості і безпеки продукції агропромислового комплексу, протокол № 13 від 6 листопада 2017 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем самостійно обґрунтовано тему і концепцію дисертації, здійснено аналіз даних літератури, розроблено схему та методологію досліджень, проведено виконання запланованих експериментальних досліджень, здійснено статистичну обробку, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено до друку публікації за темою дисертації. Формулювання основних положень, висновків і практичних рекомендацій виконано під керівництвом наукового консультанта доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента НААН В. О. Ушкалова. Низку досліджень здобувачем проведено спільно із науковими

співробітниками, які є співавторами окремих публікацій, включених до списку робіт за темою дисертації.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації доповідались, обговорювались та отримали позитивну оцінку на: XII з'їзді товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського (м. Ужгород, 2009 р.); Міжнародній науковій конференції «Microbiologic biotechnology – the scientific intensive domain of modern knowledge» (м. Кишинів, Республіка Молдова, 2011 г.); конференції спеціалістів з хвороб тварин (м. Чикаго, США, 2011 р.); науково-практичній конференції «Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів» (м. Київ, 2012 р.); ASM 113 General Meeting/American Society for Microbiology (м. Денвер, США, 2013 р.); другому щорічному регіональному науковому Симпозіумі в рамках концепції «Єдине здоров'я» (2017 SWER Ukraine Regional One Health Research Symposium) (м. Київ, 2017 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції з Міжнародною участю «Інфекційний контроль та антимікробна резистентність у галузі громадського здоров'я і ветеринарії» (м. Київ, 2017 р.); ASM/ESCMID Conference on Drug Development to Meet the Challenge of Antimicrobial Resistance (м. Бостон, США, 2017 р.); III щорічному регіональному науковому Симпозіумі в рамках концепції «Єдине здоров'я» (3<sup>rd</sup> Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium) (м. Київ, 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Цілі сталого розвитку III тисячоліття: виклики для університетів – наук про життя» (м. Київ, 2018 р.).

**Публікації.** Основні положення дисертації опубліковано в 46 наукових працях, з яких 14 статей у наукових фахових виданнях України, 6 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні іншої держави, 4 патенти на корисну модель, 3 методичні рекомендації та 18 тез наукових доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається з анотацій, вступу, огляду наукової літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел (605 джерел, з них 316 латиницею) та додатків. Дисертацію викладено на 560 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстровано 94 таблицями та 19 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертацію виконано впродовж 2009–2018 рр. у Українській лабораторії якості і безпеки продукції агропромислового комплексу Національного університету біоресурсів і природокористування України. Дослідження з вивчення біологічних властивостей та депонування штамів мікроорганізмів

проведено в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів.

**Штами мікроорганізмів.** Вивчали біологічні властивості *Salmonella spp.* (*S. cholerae suis*, *S. enteritidis*, *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum*, *S. pullorum*); *Pasteurella multocida*; *Yersinia spp.* (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*); *Listeria spp.* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. welshimeri*, *L. innocua*); *Campylobacter spp.* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*); штами *Escherichia coli* серотипів O157, 688, 4, 723, 866, 957, 987, 64; *Bacillus anthracis* Sterne 34F2; ізолятів *E. coli* та *Salmonella spp.* групи D.

**Тварини.** В експериментах *in vivo* використовували білих мишей вагою 16–18 г у кількості 2430 особин, білих мишей вагою 10–12 г у кількості 100 особин, кролів віком 2 місяці та вагою 1,7 кг у кількості 94 особини, мурчаків вагою 250–400 г у кількості 400 особин.

Дослідження на тваринах проводили з урахуванням «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», відповідно до положень Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (м. Страсбург, 1986 р.) із дотриманням вимог Закону «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2008) та Директиви ЄС 86/609/ЄС від 24.11.1986 р.

**Матеріали.** Для проведення досліджень готували та проводили контроль поживних середовищ відповідно до ДСТУ ISO/TS 11133-1:2005, ДСТУ ISO/TS 11133-2:2006, ISO 11133:2014; лабораторний посуд – відповідно до ДСТУ ISO 1042:2005. З метою визначення концентрації життєздатних мікроорганізмів готували зразки відповідно до ДСТУ ISO 6887-1:2003. Антигенну структуру *Salmonella spp.* визначали в реакції аглютинації на склі із сироватками сальмонельозними O-комплексними і монорецепторними O- та H-аглютинуючими; *Y. enterocolitica* визначали в реакції аглютинації на склі із сироватками діагностичними до *Y. enterocolitica* O-моновалентними кролячими сухими для реакції аглютинації; патогенність *Y. enterocolitica* визначали із сироватками вірулентних ієрсиній для реакції аглютинації. Вірулентність штамів визначали на білих мишах шляхом визначення величини DL<sub>100</sub>, у серійних розведеннях, попередньо визначивши кількість колонієутворюючих одиниць (КУО/см<sup>3</sup>); розрахунки проводили за методом Кербера в модифікації Ашмаріна допомогою програми Excel. Чутливість мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів визначали диско-дифузійним методом із використанням дисків із мінімальними концентраціями препаратів (пеніцилінів, цефалоспоринів, карбопенемів, хінолонів, аміноглікозидів, тетрациклінів, макролідів, лінкозамідів, нітрофуранів, хлорамфеніколу, ванкоміцину, рифампіцину, поліміксину В) виробництва компанії HiMedia та «НИЦФ» (м. Санкт-Петербург, Російська Федерація). Під час розробки ПЛР-тест-систем для детекції *Y. enterocolitica*, *Listeria spp.*, *Campylobacter spp.* розрахунок оригінальних пар праймерів виконували за допомогою програмного забезпечення «Vector NTI» v.11.0.1 (Invitrogen), а синтез виконаний у «Thermo Hybrid. BioSciences» (Федеративна Республіка Німеччина); випробування праймерів проводили на чотирьохканальному ампліфікаторі «Терцик» НВФ

«ДНК-Технологія» (Російська Федерація). Під час розроблення засобів для детекції методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*, *stx1*, *stx2* *E. coli* нуклеотидну послідовність праймерів та флуоресцентних зондів було підбрано із використанням програми Primer Express (Applied Biosystems); випробування праймерів проводили за допомогою приладу для проведення полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі BioRad CFX96. Для визначення чутливості праймерів отримували різні концентрації гомологічних зразків (бактеріальних культур) шляхом серійних розведень від  $1 \times 10^{10}$  до  $0,1 \times 10^1$  КУО/см<sup>3</sup>.

Сублімаційне висушування бактерій проводили в апараті LP-3 фірми TelStar із глибоким вакуумом 0,17 мВ і температурою конденсора 45–50 °С відповідно до «Методических рекомендаций по разработке режимов замораживания-высушивания биологических препаратов» (1981).

Ізоляцію та ідентифікацію *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Campylobacter spp.*, *E. coli* здійснювали відповідно до чинних методик.

З метою визначення ефективності способів для індикації *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*, генів шиготоксинуутворення (*stx1* та *stx2*) *E. coli* методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі встановлювали їх специфічність, чутливість та відтворюваність. Визначення специфічності, чутливості та відтворюваності Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій виду *Yersinia enterocolitica* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Yersinia enterocolitica* – ПЛР-Тест», Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Listeria spp.* – ПЛР-Тест», Діагностичного набору для виявлення ДНК *Campylobacter spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Campylobacter spp.* – ПЛР-Тест» здійснювали відповідно до «Методики державних комісійних випробувань» (розглянуто та схвалено на засіданні методичної комісії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів, протокол № 2 від 18.02.2013 р.).

Під час розроблення захисного середовища в якості прототипного використовували середовище Файбіча; випробовували експериментальні зразки: ЗС № 1 (желатин – 1,0 %; сахароза – 10,0 %, вода дистильована – 74 %, сироватка крові – 15 %); ЗС № 2 (желатин – 1,0 %; сахароза – 10,0 %, вода дистильована – 74 %, дефібринована кров барана – 15 %). Визначали концентрацію життєздатних мікробних клітин після 1-, 3-, 6- та 12-місячного зберігання в ліофільному стані. Селективність добавки (гентаміцину сульфат 2,0 мг; цефалексину 156 мг; рифампіцину 150 мг на 1 л поживного середовища) випробовували на тест-штамах *S. jejuni*, *E. coli* ATCC 25922, *S. enteritidis* 34, *L. monocytogenes* ATCC 19112, *P. multocida* 656, *St. aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* НХ 19 № 222, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2853.

Визначали вплив наночастинок Ауруму розміром 10 нм, 20, 30, 45 нм у п'яти кінцевих концентраціях за металом: 1,1 мкг/мл; 1,38; 2,77; 5,53; 11,06 мкг/мл на культуральні властивості *E. coli* Г 35-№1, *E. coli* 3-413 за культивування у МПБ. Вплив на культуральні властивості *Bac. anthracis Sterne 34F2* наночастинок Ауруму розміром  $30,4 \pm 0,5$  нм з концентрацією Ауруму

19±2 мкг/мл визначали шляхом додавання до середовища Хотінгера наночастинок у співвідношенні 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12 та 1:20. Вплив наночастинок Бісмуту розміром 40 нм встановлювали відповідно до Методичних рекомендацій «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» (МУК 4.2.1890-04), методом дифузії в агар (препарат № 1: 15,5 мг/мл за металом із кінцевими концентраціями у поживних середовищах: 0,14 мг/мл, 0,70, 1,40, 3,88 мг/мл за металом; препарат № 2: 13,9 мг/мл за металом з кінцевими концентраціями 0,13 мг/мл, 0,63 та 1,26 мг/мл за металом; препарат № 3: 77,5 мг/мл за металом з кінцевими концентраціями 6,50 та 12,90 мг/мл). Визначали вплив препаратів на *Listeria spp.*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.* (засівні дози: 10<sup>3</sup> КУО; 10<sup>4</sup>; 10<sup>5</sup>; 10<sup>6</sup> КУО).

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою пакета прикладних програм Microsoft Excel 2003 (for Windows XP). Вірогідність отриманих результатів оцінювали за критерієм Ст'юдента. Для одержання статистично вірогідних результатів під час виконання досліджень зазначені параметри визначали у п'ятиразовій повторності.

## РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Вивчення біологічних властивостей *Salmonella spp.*, визначення їх особливостей у R-форм, L-форм протопластного та сферопластного типів.** У результаті вивчення *Salmonella spp.*, виділених із трупів поросят, телят, птиці, з обладнання ферм та яловичини встановлено рівень патогенності ізолятів для білих мишей. Так, культури сероварів *S. cholerae suis*, *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. enteritidis* патогенні для 100 % білих мишей у дозі – 1,0×10<sup>10</sup> КУО (DL<sub>100</sub>). Визначено DL<sub>50</sub> для штамів *S. cholerae suis* – ≥1,0×10<sup>9</sup> КУО; DL<sub>50</sub> для штамів *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. enteritidis* – ≤1,0×10<sup>8</sup> КУО (рис. 1).

У двох R-дисоціантів *S. cholerae suis* та двох R-дисоціантів *S. Typhimurium* відмічали істотне зниження ферментативної активності: культури втрачали аглютинабельні властивості в реакції аглютинації; в дозах 1,0×10<sup>10</sup> КУО дисоціанти були авірулентні для білих мишей. Двократні пасажі через білих мишей вагою 8–10 г (тваринам вводили добові агарові культури на фізіологічному розчині, в дозах 1,0×10<sup>9</sup> КУО, в об'ємі 0,3 см<sup>3</sup> внутрішньом'язово) не призводили до реверсії в S-форму культури *S. typhimurium a/r*; під час спостереження за зараженими тваринами впродовж 10 діб клінічних проявів захворювань не реєстрували. Із крові серця та внутрішніх органів підданих евтаназії тварин виділяли однорідні за морфологією R-форми *S. typhimurium a/r*.

*Salmonella spp.* у L-формах проявляли знижену ферментативну активність, втратили здатність продукувати сірководень та редукувати нітрати в нітрити. Аглютинуюча здатність у реакції аглютинації знижувалася, культури сферопластного типу аглютинувалися лише O-комплексними та H-аглютинуючими сироватками I фази; L-форми протопластного типу –

О-комплексними сироватками за типом сумнівної реакції. Вірулентність *Salmonella spp.* L-форм сферопластного типу знизилася на 3 lg, L-форм протопластного типу – на 4 lg; двократні пасажі на білих мишах вагою 8–12 г не призводили до реверсії L-форм культур у S-форму.

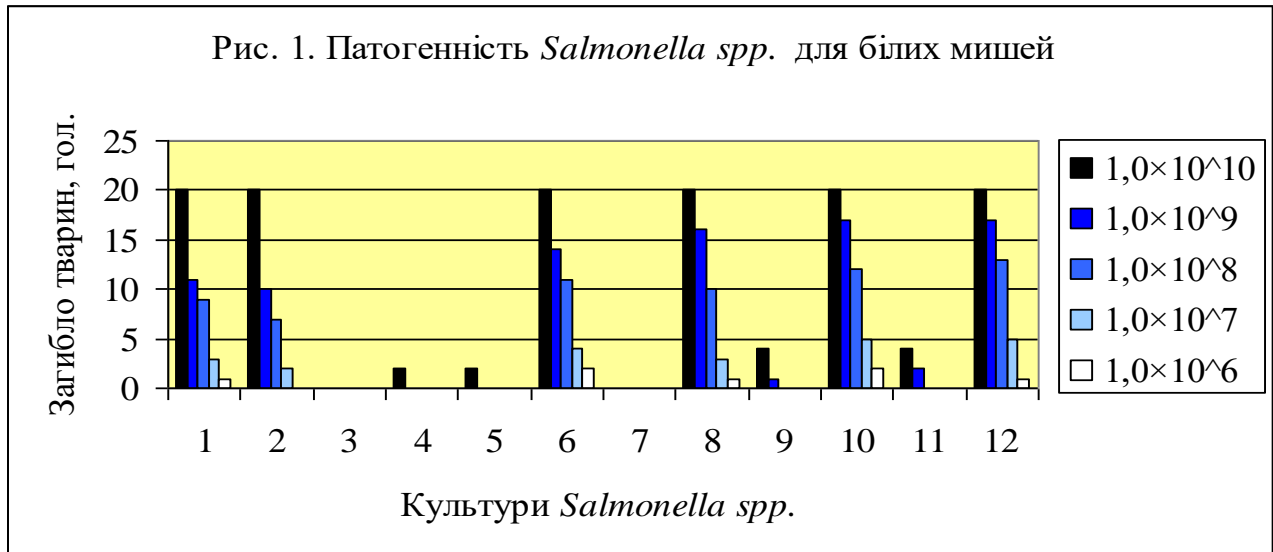


Рис. 1. Патогенність S-форм культур *Salmonella spp.* для білих мишей: 1 – *S. cholerae suis a* (S-форма); 2 – *S. cholerae suis b* (S-форма); 3 – *S. cholerae suis c* (R-форма); 4 – *S. cholerae suis a/l-b* (L-форма сферопластного типу); 5 – *S. cholerae suis f* (L-форма сферопластного типу); 6 – *S. typhimurium a* (S-форма); 7 – *S. typhimurium b* (R-форма); 8 – *S. typhimurium c* (S-форма); 9 – *S. typhimurium d* (L-форма сферопластного типу); 10 – *S. dublin a* (S-форма); 11 – *S. dublin c* (L-форма протопластного типу); 12 – *S. enteritidis a* (S-форма)

Встановлено, що 100 % досліджених *Salmonella spp.* високочутливі до карбопенемів та нечутливі до бензілпеніциліну.

Виявлено особливості чутливості до антибактеріальних препаратів певних фармакологічних груп *Salmonella spp.* у межах серотипу: із групи пеніцилінів *S. typhimurium* чутливі до ампіциліну та піперациліну; із цефалоспоринів до препаратів I–IV поколінь чутливі *S. typhimurium*, до препаратів III покоління чутливі *S. cholerae suis*, *S. dublin*, *S. enteritidis*; до хінолонів чутливі *S. cholerae suis* (за виключенням флоксацину) та *S. typhimurium*; до хлорамфеніколу чутливі *S. dublin* та *S. enteritidis*; до рифампіцину чутливі *S. cholerae suis*; до поліміксину В чутливі *S. typhimurium* (табл. 1).

Встановлено характер змін, що відбуваються за R-дисоціації, L-трансформації *Salmonella spp.* у чутливості до антибактеріальних засобів. Вектор змін залежить від біологічних властивостей штамів, притаманних відповідному їм серотипу, виду мінливості (R, L(B), L(A)), особливості фармакологічної дії препаратів (табл. 1).

**Розроблення засобів індикації *Salmonella spp.* на основі реакції аглютинації та полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.** Керуючись чинними рекомендаціями щодо бактеріологічної діагностики

сальмонельозу (ДСТУ EN 12824:2004, ДСТУ 4769:2007) ідентифікувати збудника у разі виявлення *R*-, *L*-форм протопластного типу не можливо. Проте відомо, що *L*-форми сферопластного типу можуть бути виявлені за допомогою серологічних реакцій (Ефимочкина Н. Р., 2009; Domingue G. J., Woody H. B., 1997); *R*-форми, *L*-форми сферопластного та протопластного типів можуть бути виявлені молекулярно-генетичними методами (Wall S., 1993; Романова М. Ю., 1996).

Таблиця 1

Чутливість *Salmonella spp.* до антибактеріальних препаратів

Препарат	<i>S. ch. suis</i>			<i>S. typhimurium</i>			<i>S. dublin</i>	
	<i>S</i> -форми	<i>R</i> -форми	<i>L</i> -форми	<i>S</i> -форми	<i>R</i> -форми	<i>L</i> -форми	<i>S</i> -форми	<i>L</i> -форми
Бензілпеніцилін	р			р			м/ч	
Ампіцилін, Піперацилін	р м/ч	↑	↑	ч	↓	↓	р	↑
Цефалоспорини	ч(м/ч)	↑	↑	ч	↓	↓	р(м/ч)	↑
Карбапенеми	ч	↓	б/з	ч	↓	↓	ч	↓
Аміноглікозиди	р(м/ч)	↑	↑	ч	↓	↓	р	↑
Макроліди	р	б/з	б/з	р	б/з	б/з	м/ч	б/з
Лінкозаміди	р	б/з	б/з	р	б/з	б/з	м/ч	б/з
Тетрацикліни	р	↑	↑	м/ч	б/з	б/з	р	↑
Хінолони	ч(м/ч)	↑	↑	ч	↓	↓	р(м/ч)	↑
Нітрофурани	м/ч	↓	б/з	м/ч	б/з	б/з	м/ч	↑
Азоли	р	↓	б/з	р	б/з	↓	р	б/з
Амфотерицин Б	р	↑	б/з	р	б/з	б/з	р	б/з
Хлорамфенікол	м/ч	↓	↑	р	↑	↑	ч	↓
Ванкоміцин	м/ч	↓	б/з	м/ч	↓	б/з	м/ч	↑
Рифампіцин	ч	↓	↓	р	б/з	↑	р	б/з
Поліміксин В	р	б/з	б/з (В) ↑(А)	ч	↓	↓	м/ч	↓

Примітка. «р» – резистентні; «ч» – чутливі; «м/ч» – малочутливі; «↑» – підвищення чутливості; «↓» – зниження чутливості; «б/з» – без змін; «(В)» – *L*-форми сферопластного типу; «(А)» – *L*-форми протопластного типу

З метою прижиттєвої діагностики сальмонельозу тварин, що спричинений сальмонелами груп В та Д розроблено «Набір антигенів для діагностики сальмонельозів тварин (РП «ВВ-00189-06-10» від 24.03.2010 р.), призначений для виявлення специфічних антитіл у крові тварин. Розроблений набір є специфічним, встановлено активність антигенів (груп В і D) у титрі 1:4.

Для індикації ДНК *Salmonella spp.* розроблено «Спосіб індикації *Salmonella spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі» (патент України на корисну модель); використовували оригінальні праймери і флуоресцентний зонд із наступною нуклеотидною послідовністю (табл. 2).

Встановлено ефективність застосування методу полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі для детекції *Salmonella spp.*: метод забезпечує детекцію ДНК *Salmonella spp.* (*S. cholerae suis*, *S. typhimurium*, *S. dublin* *S*-форм, *L*-форм сферопластного та протопластного типів; *S. gallinarum* *S*-форм) у зразках із мінімальною концентрацією збудника  $1 \times 10^1$  КУО/см<sup>3</sup> (рис. 2).

Нуклеотидні послідовності праймерів для детекції *Salmonella spp.*

Позначення	Нуклеотидна послідовність
LimF	5'-TAATTTCTTCCGTGGCTTCG-3'
LimR	5'-CTTTGACTGGGACAGCAACA-3'
LimP	5'-FAM-TTCCGGATAGATCAGGATGG-BHQ1-3'

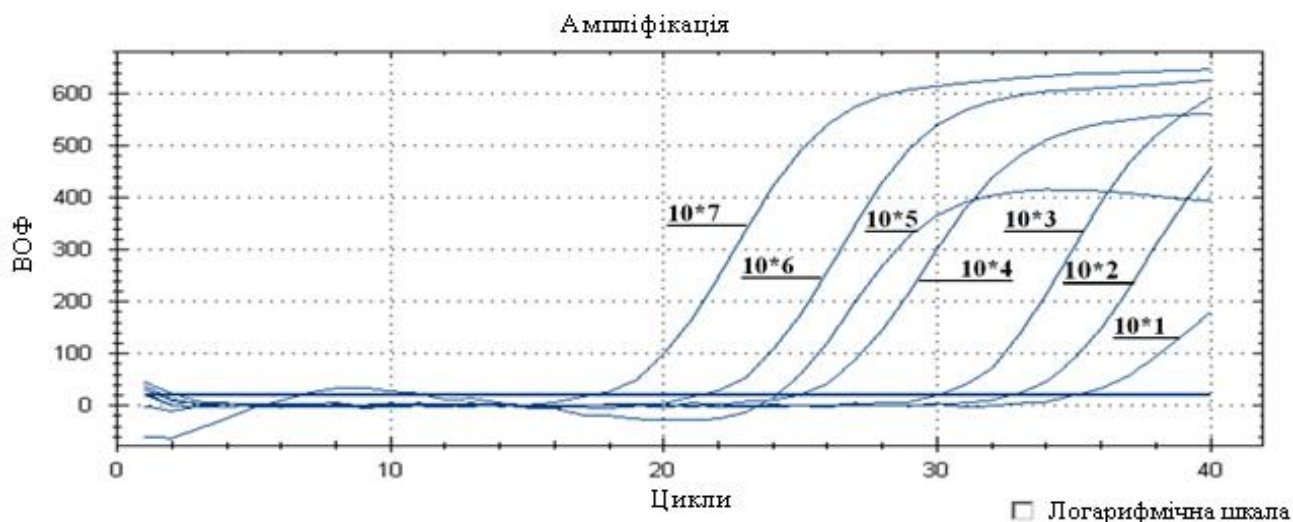


Рис. 2. Визначення чутливості способу індикації *Salmonella spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі до штаму *S. cholerae suis a/L-a* (L/п) у L-формі протопластного типу:  $10^7$  –  $1 \times 10^7$ ;  $10^6$  –  $1 \times 10^6$ ;  $10^5$  –  $1 \times 10^5$ ;  $10^4$  –  $1 \times 10^4$ ;  $10^3$  –  $1 \times 10^3$ ;  $10^2$  –  $1 \times 10^2$ ;  $1 \times 10^1$  КУО/см<sup>3</sup>

**Вивчення біологічних властивостей *Yersinia spp.*, визначення їх особливостей за умови S- R-дисоціації.** Збудники ієрсиніозів поширені в довкіллі та мають ряд спільних загальнонародових ознак, що необхідно враховувати під час проведення міжвидової диференціації збудників. Виходячи з того, що температурний фактор є одним із найважливіших, що визначають мінливість *Yersinia spp.* і стійкість їх у зовнішньому середовищі, вивчали біологічні властивості *Y. pseudotuberculosis* (38 культур) та *Y. enterocolitica* (30 культур) за двох температурних режимів: 23 °С в S-формі та 37 °С S-R-формі.

Досліджені ізоляти *Y. pseudotuberculosis* мали типові для виду культурально-морфологічні, тинкторіальні, ферментативні та сахаролітичні властивості. За температури культивування 23 °С утворювали колонії S-форми. Із досліджених ізолятів, виділених із різних об'єктів, 60,5 % були високовірулентними у кератокон'юнктивальній пробі для морських свинок, 26,3 % – помірно вірулентними, 13,1 % – низьковірулентними. Прямої залежності між об'єктом виділення культури та рівнем її патогенності не встановлено.

Пасажування культур у температурному режимі 23 °С не викликало істотних змін у рівні патогенності *Y. pseudotuberculosis*.

У разі культивування за температури 37 °С *Y. pseudotuberculosis* активно дисоціювали в R-форму, що супроводжувалося втратою рухливості, значним

зниженням ферментативної активності та частковою втратою цукролітичних властивостей. Упродовж 4 пасажів *in vitro* знизився рівень патогенності культур: культури, що викликали в *S*-формі за інтракон'юнктивального введення прогресуючий кератокон'юнктивіт у заражених тварин, у *R*-формі після I пасажу викликали помірні симптоми, в *R*-формі після IV пасажу – незначні симптоми кератокон'юнктивіту (табл. 3).

Таблиця 3

### Патогенні властивості *Y. pseudotuberculosis* (n=5)

№ штаму	Об'єкт виділення	I пасаж		IV пасаж	
		23 °C	37 °C	23 °C	37 °C
337	Змиви з моркви	+++	++	+++	+
3394	Змив із чистої чашки	+++	++	+++	+
757	Внутрішні органи лисиці	+++	++	+++	+
270	Внутрішні органи зайця	+++	++	+++	+
632	Внутрішні органи зайця	+	+	+	±
630	Внутрішні органи зайця	+++	++	+++	+

Примітка. «±» – дуже слабо виражені ознаки патогенності; «+» – слабо виражені ознаки патогенності; «++» – помірні ознаки; «+++» – високопатогенні культури

Пасаж через білих мишей вагою 8–10 г (тваринам вводили добові агарові культури на фізіологічному розчині в дозах  $1,0 \times 10^9$  КУО, в об'ємі 0,3 см<sup>3</sup> внутрішньом'язово) привів до реверсії *R*-форми штаму *Y. pseudotuberculosis* 197 у *S*-форму: тварини загинули впродовж 48 год, із крові серця загиблих тварин було виділено *Y. pseudotuberculosis* в *S*-формі.

У результаті визначення ферментативних, цукролітичних, антигенних, патогенних властивостей та проведення біотипування *Y. enterocolitica*: 15 авірулентних культур, виділених з овочів та від синантропних гризунів віднесено до біотипу 1А; 15 патогенних культур, які ізольовані з різних об'єктів дослідження – хворі люди – 4 культури (біотип 4, серотип О:3), польові миші – 1 культура (біотип 4, серотип О:3), овочі – 5 культур (4 культури – біотип 4, серотип О:3 та 1 культура – біотип 3, серотип О:5,27), молоко – 4 культури (біотип 1В, серотип О:8 (існує значна подібність у антигенній структурі *Y. enterocolitica* серотипів О:8; О:18 і О:21 та *Y. pseudotuberculosis* серотипу О:1; *Y. pestis* походять від *Y. pseudotuberculosis* серотипу О1b).

*Y. enterocolitica* під час культивування за температури 37 °C частково (до 30 %) дисоціювали в *S-R*-форму; це проявлялося у поліморфізмі бактеріальних клітин та характерними для *S*-форм та *S-R*-форм культуральними ознаками, втратою рухливості, аглютинуючої здатності та патогенності (за результатами реакції аглютинації із сироватками типоспецифічними О:3, О:8 та сироваткою вірулентних ієрсиній).

Серед досліджених культур *Y. pseudotuberculosis* 100 % були чутливими та високочутливими до цефалоспоринів, карбопенемів, тетрациклінів, хінолонів, фторхінолонів та хлорамфеніколу (табл. 4).

Чутливість *Yersinia spp.* до антибактеріальних препаратів

Група препаратів	<i>Y. pseudotuberculosis</i>		<i>Y. enterocolitica</i>
	S-форми	R-форми	S-форми
Природні пеніциліни	р	↓	ч 20 % (бензилпеніцилін)
Напівсинтетичні пеніциліни	ч	↓	ч 73,3 % (піперацилін); р 96,7 % (ампіцилін)
Цефалоспорини I–IV поколінь	ч (100 %)	↓	ч 30 %
Карбопенени	ч (100 %)	↑	ч 93,33 % (іміпенем); ч 73,33 % (меропенем)
Аміноглікозиди I–III поколінь	ч (100 %)	б/з (канаміцин гентаміцин); ↑ (стрептоміцин); ↓ (нетилміцин)	ч 60 % (I–II покоління)
Макроліди	р; ч (азітроміцин)	↓ (еритроміцин, олеандоміцин); б/з (азітроміцин)	р; <6,7 % ч
Лінкозаміди	ч (50 %); р (50 %)	↑ (лінкоміцин); ↓ (кліндаміцин)	р; <10 % ч
Тетрацикліни	ч (100 %)	↑	ч 100 % (доксидиклін); ч 73,3 % (тетрациклін)
Хінолони I–III поколінь	ч (100 %)	↑ (норфлораксацин, левофлораксацин, лемефлораксацин); ↓ (пефлораксацин); б/з (ципрофлораксацин)	р (56,7 %); ч 80 % (II покоління)
Нітрофурани	м/ч; ч 100 % (фурадонін)	б/з; ↓ (фурадонін)	м/ч; <10 % ч
Амфотерицин В	р; <5% ч	↑	р; 13,3 % ч
Хлорамфенікол	ч (100 %)	↓	ч; м/ч; серогрупа O:8 ч
Ванкоміцин	ч; <5 % р	↓	не визначали
Рифампіцин	р; <5 % ч	↓	р
Поліміксин В	р	↑	не визначали

Примітка. «р» – резистентні; «ч» – чутливі; «м/ч» – малочутливі; «↑» – підвищення чутливості; «↓» – набуття резистентності; «б/з» – без змін

Культури були також чутливі до напівсинтетичних пеніцилінів, фурадоніну (100 %), ванкоміцину (71 %). Ці культури були резистентними до природних пеніцилінів, азолів, амфотерицину В, рифампіцину, поліміксину В. До лінкозамідів виявилися чутливими 50 % культур, а до нітрофуранів більшість культур були малочутливими.

R-форми *Y. pseudotuberculosis* набували резистентності до природних та напівсинтетичних пеніцилінів, цефалоспоринів (крім цефалотину),

хлорамфеніколу, ванкоміцину та рифампіцину. Набували чутливості до карбопенемів, тетрациклінів, поліміксину В, амфотерицину В. До аміноглікозидів; макролідів, лінкозамідів, хінолонів та нітрофуранів чутливість *R*-форм *Y. pseudotuberculosis* проявлялася неоднозначно та варіювала в межах кожної фармакологічної групи (табл. 4).

Встановлено, що більшість досліджених *Y. enterocolitica* чутливі до піперациліну із групи карбоксипеніцилінів, цефалоспоринів III покоління, карбопенемів, фторхінолонів II–III поколінь, аміноглікозидів II покоління (табл. 4). Більшість культур були стійкими до бензілпеніциліну, ампіциліну, цефалоспоринів I та II поколінь. Порівнюючи рівень чутливості виділених культур, можна зазначити, що культури, виділені від людини більш резистентні до ряду антибіотиків, ніж культури, виділені з овочів і від синантропних гризунів у межах серогрупи/біотипу (рис. 3).

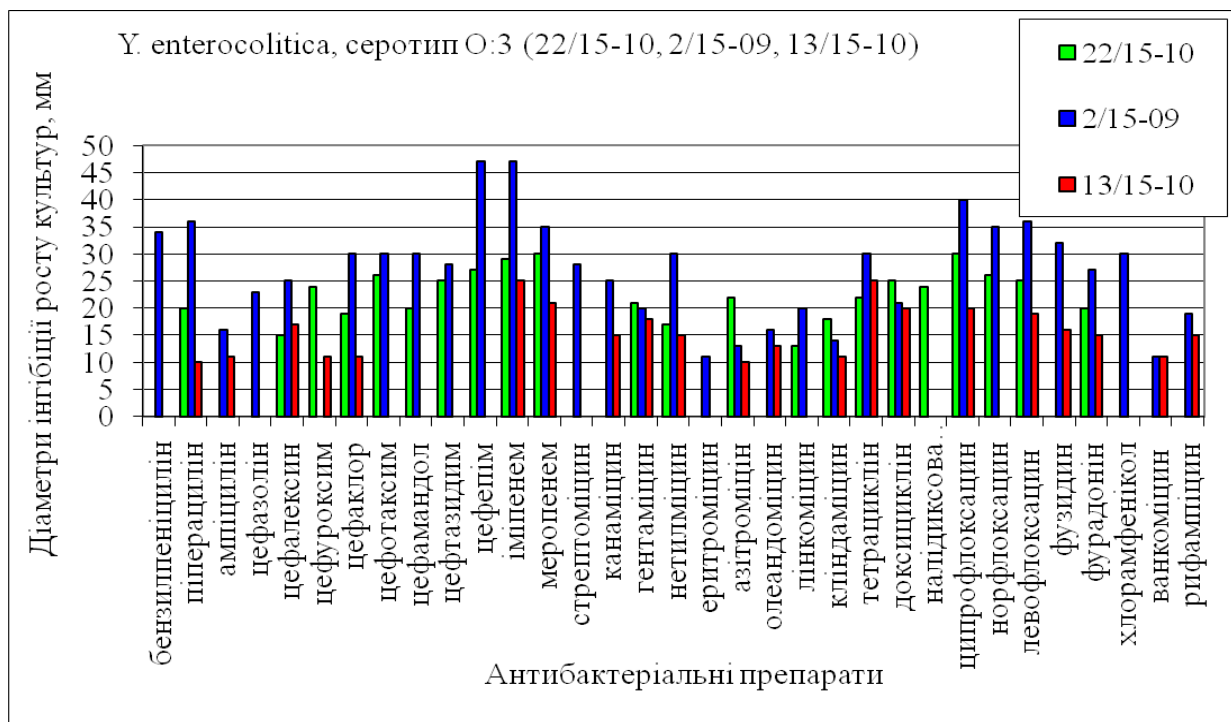


Рис. 3. Чутливість до антибактеріальних препаратів *Y. enterocolitica*

За результатами досліджень з метою подальшого використання у ветеринарній біотехнології Національним центром штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів проведено процедуру первісного депонування досліджених штамів *Y. enterocolitica* та *Y. pseudotuberculosis*. З метою тривалого зберігання культури *Y. enterocolitica* та *Y. pseudotuberculosis* було ліофілізовано на модифікованому середовищі Файбіча з додаванням аеросилу А-300 в концентрації 0,1 %. Збереженість культур, ліофілізованих у *S*-формах, становила в середньому 84,95 %; ліофілізовані в *R*-формах культури, не вегетували на рідких та щільних поживних середовищах.

Колекцію депонованих *Y. enterocolitica* та *Y. pseudotuberculosis* та ліофілізованих *R*-форм культур, які втратили здатність до вегетації *in vitro*, було використано під час розроблення «Діагностичного набору для виявлення ДНК

бактерій виду *Yersinia enterocolitica* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Yersinia enterocolitica* – ПЛР-Тест» (РП «ВВ-00678-06-14» від 03.04.2014 р.).

У процесі державних комісійних міжвідомчих випробувань дослідної серії набору встановлено високу специфічність та відтворюваність; засіб забезпечує індикацію *Y. enterocolitica*, які втратили здатність до вегетації *in vitro*; чутливість засобу становить 100 КУО/см<sup>3</sup>.

#### **Вивчення біологічних властивостей штамів *Pasteurella multocida*.**

Пастерельоз – природно-вогнищевий трансмісивний зооноз. Збудник (*P. multocida*), здатний циркулювати у природних вогнищах разом зі збудником чуми (*Y. pestis*), має високу вірулентність, викликає захворювання, за перебігом подібний до бубонної або легеневої форми чуми, проявляє фенотипічні властивості, аналогічні *Y. pestis*, що враховується у разі проведення регламентованої диференціальної діагностики ієрсиніозів, зокрема чуми. З цією метою вивчено біологічні властивості штамів *P. multocida* з колекції Національного центру штамів мікроорганізмів (№ № 2, 5, 550, 15, 16, 17, «Smoll»).

Досліджувані культури мали типові для *P. multocida* культурально-морфологічні та ферментативні властивості; за ступенем вірулентності для білих мишей (за внутрішньом'язевого зараження) були поділені на три групи: високовірулентні штами *P. multocida* 550 та Smoll ( $DL_{100} = 0,5 \times 10^1$  КУО), викликали загибель 100 % тварин впродовж 14 год; штами *P. multocida* № № 5, 15, 16 із середнім показником вірулентності ( $DL_{100} = 0,5 \times 10^4$  КУО), викликали загибель тварин впродовж 24 год; штами *P. multocida* № № 2, 17 із більш низьким рівнем вірулентності ( $DL_{100} = 0,5 \times 10^6$  КУО), викликали загибель тварин впродовж 24 год (табл. 5).

Таблиця 5

#### **Вірулентність штамів *P. multocida***

Штами <i>P. multocida</i>							
DL <sub>100</sub> , КУО, для білих мишей (16–18 г), n=30	2	5	15	16	17	550	Smoll
	0,5×10 <sup>6</sup>	0,5×10 <sup>4</sup>	0,5×10 <sup>4</sup>	0,5×10 <sup>4</sup>	0,5×10 <sup>6</sup>	0,5×10 <sup>1</sup>	0,5×10 <sup>1</sup>
DL <sub>100</sub> , КУО, для кролів (1,7 кг), n=6	не визначали					1,4×10 <sup>6</sup>	1,1×10 <sup>6</sup>

Примітка. DL – летальна доза

DL<sub>100</sub> *P. multocida* 550 для кролів вагою 1,7 кг за внутрішньом'язевого зараження – 1,4×10<sup>6</sup> КУО; *P. multocida* Smoll – 1,1×10<sup>6</sup> КУО (табл. 5).

Чутливість *P. multocida* до антибактеріальних препаратів представлено в табл. 6, з даних якої видно, що *P. multocida* були чутливі до: хлорамфеніколу (100 %); пеніцилінів (77,8 %); цефалоспоринів (53 %): у 33,3 % випадків – до препаратів I покоління; у 55,6 % випадків – до препаратів II покоління; у 46,7 % випадків – до препаратів III покоління; 50 % культур були чутливі до цефтібутену (IV покоління). Досліджені *P. multocida* проявляли чутливість до карбпенемів (83,33 %), аміноглікозидів (82,5 %), хінолонів (73,8 %),

нітрофуранів (70,8 %), поліміксину В (66,7 %), рифампіцину (66,7%). До макролідів *P. multocida* проявляли чутливість у 50 % випадків (до препаратів I покоління культури були чутливі у 44,4 % випадків). Культури у 83,3 % були чутливими до азітроміцину; до лінкозамідів – у 41,7 % випадків; до амфотерицину В чутливі у 50 % випадків (табл. 6, рис. 4). До похідних імідазолу *P. multocida*, в основному, не чутливі та 12,5 % культур проявляли чутливість до певних препаратів. До ністатину була чутлива одна культура. До ванкоміцину *P. multocida* були резистентними.

Таблиця 6

**Чутливість *P. multocida* до антибактеріальних препаратів**

Група препаратів	<i>P. multocida</i> – S-форма		R-форма
	результат	примітка	
Пеніциліни	ч (77,8 %)	–	↓ (бензилпеніцилін, піперацилін) б/з (ампіцилін)
Цефалоспорины I–IV поколінь	ч (53 %)	ч 33,3 % (I покоління); ч 55,6 % (II покоління); ч 46,7 % (III покоління); ч 50 % (IV покоління)	↑ (цефуроксим, цефоперазон)
Карбопенемі	ч (83,33 %)	–	Зміни в залежності від препарату
Аміноглікозиди	ч (82,5 %)	–	↓
Макроліди	ч (50 %)	ч (азітроміцин)	↓
Лінкозаміди	ч (41,7 %); м/ч	–	↓ (лінкоміцин); ↑ (кліндаміцин)
Тетрацикліни	ч (41,7 %); м/ч		↓
Хінолони I–III поколінь	ч (73,8 %)		↑
Нітрофурани	ч (70,8 %)	–	↓
Азоли	р	12,5 % ч	↓
Амфотерицин В	ч(50 %)		Не аналізували
Хлорамфенікол	ч (100 %)		
Ванкоміцин	р (100 %)		
Рифампіцин	ч (66,7 %)		

Примітка. «р» – резистентні; «ч» – чутливі; «м/ч» – малочутливі; «↑» – підвищення чутливості; «↓» – набуття резистентності; «б/з» – без змін

Встановлено, що рекомендовані EUCAST (версія 8) скринінги чутливості *P. multocida* до: доксіцикліну за тетрацикліном є негативними у 75 % культур; до фторхінолонів за тестом із налідиксовою кислотою є негативними у 66,7 % випадків, до левофлоксацину – у 80 % культур (див. табл. 6, рис. 4).

Під час вивчення біологічних властивостей *P. multocida* за умови S-R-дисоціації встановлено, що у R-форм культур до мінімуму знижується ферментативна активність, втрачається вірулентність; двохразові пасажі через організм білих мишей (у дозах  $1,0 \times 10^9$  КУО, в об'ємі  $0,3 \text{ см}^3$  внутрішньом'язово) не призводять до реверсії культури в S-форму.

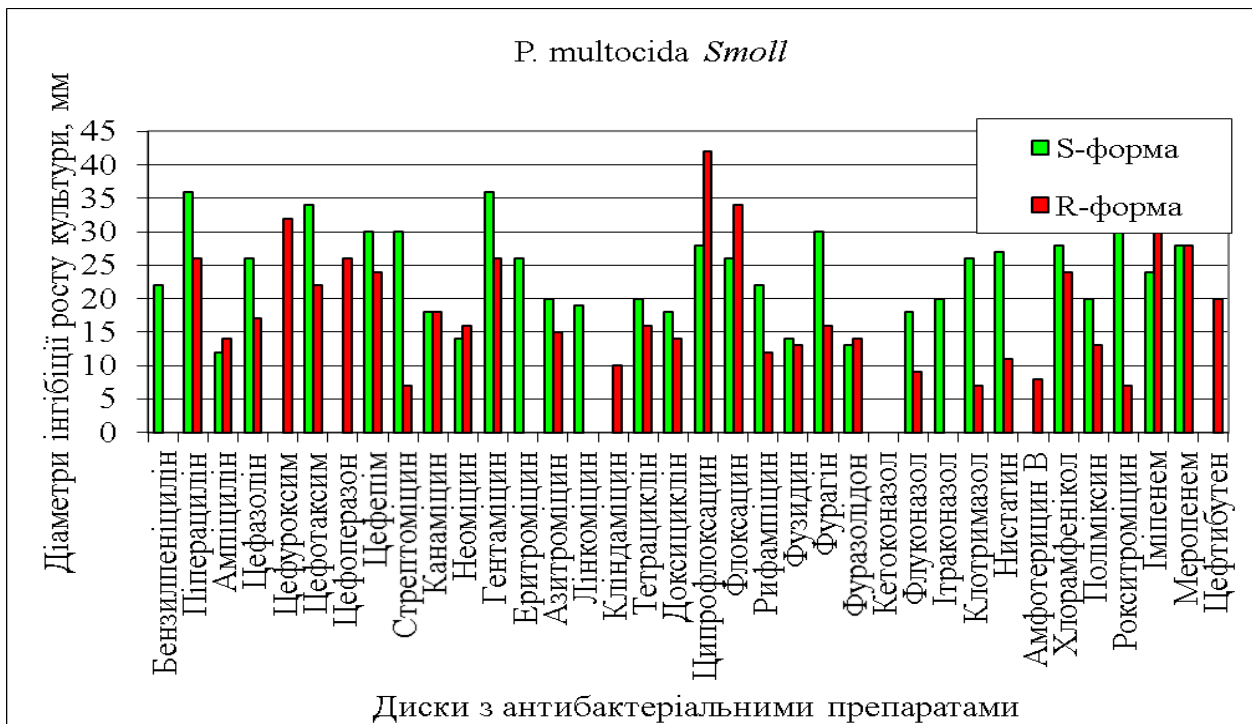


Рис. 4. Чутливість до антибіотиків *P. multocida Smoll* (Смол)

*R*-форми *P. multocida* набували резистентності до пеніцилінів, більшості цефалоспоринів, макролідів, лінкозамідів, тетрациклінів, аміноглікозидів; набували чутливості до цефуроксиму, цефоперазону, цефтібутену, більшості фторхинолонів (див. табл. 6, рис. 4). Отримані результати досліджень та вивчені культури *P. multocida* використано під час розроблення засобів ПЛР-діагностики захворювань, викликаних ентеробактеріями.

**Вивчення біологічних властивостей *Listeria spp.*** З метою удосконалення системи лабораторної діагностики лістеріозів і розроблення засобів їх індикації та диференціації було досліджено біологічні властивості *Listeria spp.* На першому етапі досліджень вивчали штами *L. monocytogenes* сероваріантів 1/2a, 1/2b, 4b, 3a, отримані з Інституту мікробіології та імунології імені І. І. Мечнікова (м. Харків) та National Veterinary Research Institute (м. Пулави, Республіка Польща). Встановлено, що штами *L. monocytogenes* сероваріанту 4b відрізняються серед штамів *L. monocytogenes* інших сероваріантів високим рівнем ферментативної та гемолітичної активності (табл. 7).

Далі вивчали біологічні властивості референтних штамів Бельгійської колекції культур (*L. ivanovii* LMG 11388, *L. seeligeri* LMG 11386, *L. grayi* LMG 16490 та *L. grayi* LMG 16491 (типовий штам для *L. murrayi*), референтних штамів з Американської колекції типових культур (ATCC) (*L. ivanovi* ATCC 19119, *L. grayi* ATCC 25401, *L. murrayi* ATCC 25401) та 30 ізолятів *Listeria spp.*, виділених із харчової сировини тваринного та рослинного походження та з об'єктів довкілля (табл. 8).

Встановлено, що референтні штами *Listeria spp.* проявляли типові для видів біологічні (культурально-морфологічні, ферментативні, гемолітичні) властивості. Серед досліджених 21 ізолятів *Listeria spp.* 5 культур мали

біологічні властивості, характерні для *L. monocytogenes*, 6 культур – для *L. ivanovii*, 2 – *L. seeligeri*, 5 – *L. grayi*, 2 – *L. murrayi*, 1 – *L. welshimeri* (табл. 8).

Таблиця 7

### Біологічні властивості *Listeria spp.*

Штам	Отриманий	Каталаза	Ксилоза	Рамноза	Діаметр зон гемолізу, мм	
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19112	ATCC	+	–	++++	5
	4в (Х/к 2/9)	Україна	+	–	++++	5
	4в (П 2/10)	Польща	+	–	++++	5
	1/2а (Х/к 2/9)	Україна	+	–	++	3
	1/2в (П 2/10)	Польща	+	–	++	3
	3а (Х/к 2/7)	Україна	+	–	++	–

Примітка. «+» – позитивний результат; «++++» – позитивний результат впродовж 24 год; «++» – позитивний результат впродовж 48 год, не повне розщеплення цукру у середовищі; «–» – негативний результат

Таблиця 8

### Біологічні властивості ізолятів *Listeria spp.*

Ізолят (кількість)	Ріст на МПА	Рухливість	Каталаза	Морфологія	Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Ксилоза	Сахароза	Маніт	Рамноза	Сорбіт	Дульцит	Інозит	Арабіноза	В-гемоліз	
					+	±	–	±	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>L. mono-cytogenes</i> (2)	L/B	±	+	гетероморфні структури	+	±	±	–	±	–	–	–	–	–	–	–	
<i>L. ivanovii</i> (1)	L/B	±	+		+	±	±	–	±	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>L. grayi</i> (1)	L/B	±	+		+	±	±	–	±	±	–	–	–	–	–	–	–
<i>L. wel-shimeri</i> (1)					±	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>L. wel-shimeri</i> (4)	L/A	–	+	±	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
<i>L. monocytogenes</i> (5)	S-форми	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	–	+	
<i>L. ivanovii</i> (6)		+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>L. seeligeri</i> (2)		+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>L. innocua</i> (р)		+	+	+	+	+	+	–	–	–	+	+	–	–	±	–	–
<i>L. welshimeri</i> (1)		+	+	+	+	+	–	+	–	–	+	+	–	+	–	–	–
<i>L. grayi</i> (5)		+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>L. murrayi</i> (2)		+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–

Примітка. «+» – позитивна реакція; «–» – негативна реакція; «±» – слабка реакція із затримкою; «L/B» – колонії типу В з оптично щільним гомогенним центром, який вростає в агар і ажурною периферією; «L/A» – колонії типу А, мають дуже дрібні розміри, складаються із гранулярних структур, позбавлених клітинної стінки, схожі на мікоплазми. За перегляду під мікроскопом (об'єктив ×10) колонії L-форм мають не дрібнозернисту, характерну для бактеріальних колоній, а мереживну структуру. Розміри колоній варіюють від 0,1 до 1–2 мм у діаметрі; «поліморфні структури» – трапляються як грамнегативні, так і грампозитивні; «р» – референтна культура

З метою використання у подальших дослідженнях культури *Listeria spp.* було піддано ліофілізації на середовищі Файбіча з додаванням аеросилу А-300 в концентрації 0,1 %. Встановлено, що збереженість культур після ліофілізації становила в середньому 43,6 %; відновлені культури видів *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* зберегли гемолітичну активність. Встановлено видові особливості чутливості до антибактеріальних препаратів – *Listeria spp.*: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. innocua* виявилися чутливими до пеніцилінів; 100 % культур були резистентними до поліміксину, азолів, амфотеріцину В та переважно резистентні до цефалоспоринів, карбопенемів, лінкозамідів (табл. 9).

Таблиця 9

### Чутливість до антибактеріальних препаратів *Listeria spp.* (n=5)

Група препарату	<i>Listeria spp.</i>						
	<i>monocytogenes</i>	<i>ivanovii</i>	<i>seeligeri</i>	<i>grayi</i>	<i>murrayi</i>	<i>welshimeri</i>	<i>innocua</i>
Пеніциліни	ч (100 %)						
Цефалоспорини	р						
Карбопенеми	р						
Аміноглікозиди	р (Δ) ч (□)	р	р (Δ) ч (□)				
Макроліди	р (олеандоміцин, азитромицин), ч (еритроміцин)	р	р (олеандоміцин, азитромицин), ч (еритроміцин)				
Линкозаміди	ч						
Тетрацикліни	ч	р	р	ч	ч	ч	ч
Хінолони I–III поколінь	<i>L. ivanovii</i> чутливі до налідиксової кислоти; до фторхінолонів II–III поколінь реєстрували чутливість культур у 21,2 % випадків						
Нітрофурани	ч (54 %)	р					
Хлорамфенікол	р (Δ) ч (□)	м/ч	р (Δ) ч (□)	м/ч	р (Δ) ч (□)	р (Δ) ч (□)	м/ч
Ванкоміцин	ч	р	р	ч	ч	ч	р
Рифампіцин	р (Δ) ч (□)	р	р	р	р	ч	р
До поліміксину В, азолів, амфотерицину В – резистентні 100 % культур)							

Примітка. «р» – резистентні; «ч» – чутливі; «м/ч» – малочутливі; «б/з» – без змін; «Δ» – ізоляти; «□» – референтні штами

До аміноглікозидів I–III поколінь резистентними були *L. ivanovii* та ізоляти *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. innocua*. Культури *L. ivanovii* виявилися резистентними до макролідів, а культури інших видів *Listeria spp.* чутливі до еритроміцину та резистентні до олеандоміцину та азитромицину. До тетрациклінів були чутливі *L. monocytogenes*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. innocua*, резистентні *L. ivanovii*, *L. seeligeri*. Із групи хінолонів *L. ivanovii* чутливі до налідиксової кислоти, штами інших досліджених видів нечутливі. До фторхінолонів II–III поколінь реєстрували чутливість культур у 21,2 % випадків. До нітрофуранів *L. monocytogenes* чутливі у 54 % випадків, культури інших досліджених видів переважно резистентні.

До хлорамфеніколу чутливі референтні культури *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. murrayi*. До ванкоміцину чутливі *L. monocytogenes*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. innocua*; малочутливі – *L. ivanovii*, *L. seeligeri*. До рифампіцину чутливі *L. welshimeri* та референтні штами *L. monocytogenes*.

Актуальним напрямом діагностики лістеріозу є вивчення біологічних властивостей *L*-форм *Listeria spp.* та їх внутрішньородова диференціація. За культурально-морфологічними, ферментативними та гемолітичними властивостями 9 ізолятів *Listeria spp.* були типові для *L*-форм *Listeria spp.* сферопластного типу (2 культури *L. monocytogenes*, 1 культура *L. ivanovii*, 1 культура *L. grayi*, 1 культура *L. welshimeri*) та протопластного типу (4 культури: *L. welshimeri*).

*L*-форми сферопластного типу утворювали на щільних середовищах колонії типу В, мали поліморфну морфологію, спостерігалось зниження рівня ферментативної активності, культури *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* втратили гемолітичні властивості та здатність ферментувати рамнозу і ксилозу відповідно. Для *L*-форм протопластного типу *Listeria spp.* були характерним утворення на щільних середовищах колоній типу А, виражений поліморфізм популяції, відсутність рухливості, прояв ферментативних властивостей на мінімальному рівні зі значною затримкою, втрата гемолітичних властивостей (див. табл. 8). Культури *L*-форм сферопластного типу набули резистентності до пеніцилінів, тетрациклінів, лінкозамідів, налідіксової кислоти.

За результатами досліджень штами *L. monocytogenes* 4b (П), *L. monocytogenes* 1/2в (П), *L. monocytogenes* 1/2 а (П), ізоляти *L. ivanovii* 5/0811, *L. seeligeri* LMG 11386, *L. grayi* 11/0811, *L. murrayi* 12/0811 піддані процедурі первісного депонування. Результати досліджень та отриману колекцію депонованих штамів та *L*-форм *Listeria spp.* використано під час розроблення засобів діагностики лістеріозів: Набору тест-штамів *Listeria spp.* для проведення САМР-test та контролю якості поживних середовищ», Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Listeria spp.* – ПЛР-Тест», «Засобу для виявлення ДНК бактерій виду *Listeria monocytogenes* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі».

**Розроблення засобів для виявлення ДНК *Listeria spp.*, *Listeria monocytogenes* методом полімеразної ланцюгової реакції.** З метою вдосконалення системи лабораторної діагностики лістеріозів було розроблено діагностичний набір для виявлення ДНК бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Listeria spp.* – ПЛР-Тест» (РП «ВВ-00643-06-13» від 11.04.2013 р.) та засіб для виявлення ДНК бактерій виду *Listeria monocytogenes* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

Відповідно до рекомендацій Міжнародного Епізоотичного Бюро (МЕБ) для виявлення та диференціації *L. monocytogenes* обов'язковим є бактеріологічний метод, проте, у разі неможливості встановити діагноз бактеріологічним методом, допускається використання альтернативних методів, зокрема полімеразної ланцюгової реакції. Під час розроблення засобу

для виявлення ДНК бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Listeria spp.* – ПЛР-Тест» було підібрано прямий *Lprs-F* та зворотній *Lprs-R* праймери, що синтезують фрагмент гену (*prs*), який є консервативним спільним для всіх видів *Listeria spp.* і кодує білок фосфорибозилпірофосфатсинтазу та забезпечують синтез фрагменту ДНК завдовжки 370 п. н. Розроблений засіб забезпечує виявлення ДНК *Listeria spp.*, у тому числі форм, які втратили здатність до вегетації *in vitro* та дає можливість виявляти ДНК *L*-форм сферопластного та протопластного типів *Listeria spp.* у зразках із мінімальною концентрацією збудника  $1 \times 10^2$  КУО/см<sup>3</sup>. Під час розроблення способу для виявлення ДНК бактерій виду *L. monocytogenes* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі для конструювання праймерів використовували ділянку гену *HlyA*, що кодує бактеріальний токсин лістеріолізін (табл. 10).

Таблиця 10

### Нуклеотидні послідовності праймерів для детекції *L. monocytogenes* методом ПЛР у реальному часі

Позначення	Нуклеотидна послідовність
LimF	CGCAAAAGATGAAGTTCAAATCA
LimR	CTCCTGGTGTTCCTCGATTAAAAGT
LimP	FAM-CGACGGCAACCTCGGAGACTTACG-BHQ1

Спосіб забезпечує індикацію ДНК *L*-форм бактерій виду *L. monocytogenes* сферопластного та протопластного типів у зразках із мінімальною концентрацією збудника  $1 \times 10^1$  КУО/см<sup>3</sup> (рис. 5).

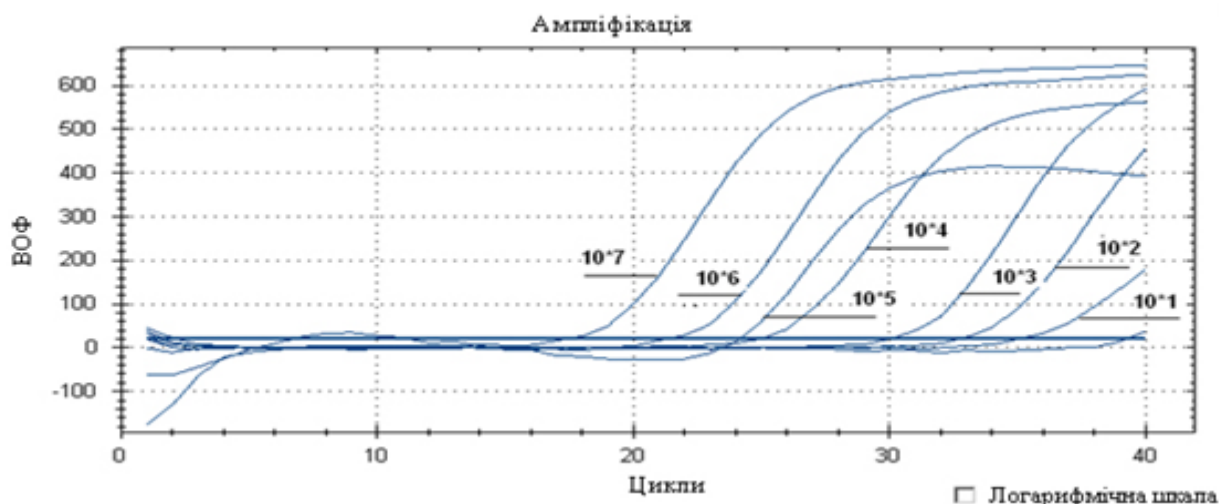


Рис. 5. Визначення чутливості засобу для індикації *Listeria monocytogenes* методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі для штаму *L. monocytogenes* УЛЯБП 2/6/3А:  $10^7$  –  $1 \times 10^7$ ;  $10^6$  –  $1 \times 10^6$ ;  $10^5$  –  $1 \times 10^5$ ;  $10^4$  –  $1 \times 10^4$ ;  $10^3$  –  $1 \times 10^3$ ;  $10^2$  –  $1 \times 10^2$ ;  $1 \times 10^1$  КУО/см<sup>3</sup>

**Вивчення біологічних властивостей термофільних кампілобактерій.** Вивчали біологічні властивості референтних штамів *S. jejuni* P., *S. coli* P. та *S. lari* P. та шість ізолятів *Campylobacter spp.*

У результаті вивчення культурально-морфологічних, ферментативних властивостей, чутливості до антибіотиків, патогенності (на білих мишах) було встановлено, що два ізоляти відносяться до виду *C. jejuni*, два – до *C. coli*, два – до *C. lari*.

Внутрішньочеревне введення білим мишам штамів у дозах  $1,0 \times 10^{10}$  КУО викликало загибель 100 % тварин; введення  $1,0 \times 10^8$  КУО культур *C. jejuni*, *C. coli* викликало загибель 10 % тварин, *C. lari* – 5 % тварин (табл. 11).

Таблиця 11

### Біологічні властивості термофільних кампілобактерій (n=5)

<i>Campylo- Bacter spp.</i>	Продукція		H <sub>2</sub> S	Гідроліз гіпурату	Редукція		Резистентність			Патогенність,%*		
	Оксидази	Каталази			Нітрагів	Селеніту	Налідиксова кислота	Цефалогін	Трифеніл- тетразолію хлорид 0,04%	1,0×10 <sup>10</sup>	1,0×10 <sup>9</sup>	1,0×10 <sup>8</sup>
<i>C. jejuni P</i>	+	+	-	+	+	+	ч	р	р	100	70	10
<i>C. jZ1</i>	+	+	-	+	+	+	ч	р	р	100	65	10
<i>C. jZ2</i>	+	+	-	+	+	+	ч	р	р	100	75	10
<i>C. coli P</i>	+	+	-	-	+	+	ч	р	ч	100	50	10
<i>C. cZ1</i>	+	+	-	-	+	+	ч	р	ч	100	45	10
<i>C. cZ2</i>	+	+	-	-	+	+	ч	р	ч	100	55	10
<i>C. lari P, C. lZ1, C. lZ2</i>	+	+	+	-	+	+	р	р	р	100	25	5

Примітка. «+» – позитивний результат; «-» – негативний результат; «ч» – чутливі; «р» – резистентні; «%» – відсоток тварин, які загинули

Досліджувані культури чутливі до еритроміцину, норфлуксацину, лінкоміцину, ципрофлоксацину, окситетрацикліну, цефазоліну, стрептоміцину; малочутливі до гентаміцину, амоксициліну, пеніциліну, цефтріаксону; резистентні до рифампіцину, цефалотину та налідиксової кислоти.

За результатами досліджень було проведено процедуру первісного депонування штаму *C. Jejuni 3C-08/12* з метою подальшого його використання у ветеринарній біотехнології. Отримані результати досліджень та штам *C. jejuni 3C-08/12* використані під час порівняння селективних добавок: комерційної добавки компанії Oxsoid та розробленої компанією Бровафарма, яка забезпечує селективну ізоляцію *C. jejuni*, пригнічуючи ріст супутньої мікрофлори (*E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocitogenes*, *P. multocida*, *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Ps. aeruginosa*).

Під час вивчення впливу температурного фактору на культуральні властивості *Campylobacter spp.* встановлено, що впродовж семи пасажів за температури 43 °C на рідкому, напіврідкому і твердому середовищах досліджені культури не втратили здатності до вегетації, однак бактеріальні клітини після четвертого пасажу набували кокоподібної форми. За температури 37 °C культури *C. jejuni* та *C. lari* вегетували впродовж трьох пасажів, після другого пасажу клітини набували кокоподібної форми. Культури *C. coli*

вегетували впродовж двох пасажів на рідкому та напіврідкому середовищах; на твердому середовищі ознак росту культур після першого пасажу не спостерігали. За температури культивування 25 °С у досліджених культур не виявляли ознак росту після першого пасажу (табл. 12).

Таблиця 12

### Культуральні властивості термофільних кампілобактерій (n=5)

Поживне середовище	<i>Campylobacter spp.</i>		
	<i>jejuni</i> (P, Z1, Z1)	<i>coli</i> (P, Z1, Z1)	<i>lari</i> (P, Z1, Z1)
ріст за t=43 °С, 48 год упродовж 7 пасажів			
Рідке, напіврідке, тверде	+	+	+
Перехід у кокову форму	IV–VII пасаж	IV–VII пасаж	IV–VII пасаж
ріст за t=37 °С, 48 год упродовж 7 пасажів			
Рідке, напіврідке	±	±	±
Тверде	±	–	±
Перехід у кокову форму	II–III пасаж	I–II пасаж	II–III пасаж
ріст за t=25 °С, 48 год			
Рідке, напіврідке, тверде	–	–	–
Перехід у кокову форму	I пасаж	I пасаж	I пасаж

Примітка. «+» – наявність характерного росту; «±» – наявність слабого росту; «–» – відсутність росту

З метою довготривалого зберігання культур термофільних кампілобактерій підбрано склад захисного середовища для сублимації та довготривалого зберігання. Встановлено стабілізуючий вплив на клітини запропонованого середовища (із вмістом сироватки крові коня), яке забезпечувало виживання 45,71 % клітин у процесі кріоконсервації та подальшої сублимації; середовище забезпечує виживання термофільних кампілобактерій впродовж 12 місяців на рівні 6,77 % від вихідної концентрації клітин після ліофілізації.

Отримані результати використано в подальшій роботі з тест-культурами *Campylobacter spp.* у колекції Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів, під час розроблення діагностичної тест-системи «*Campylobacter spp.* – ПЛР-Тест» та під час написання методичних рекомендацій «Термофільні кампілобактерії: методи виявлення, диференціації, антибіотикорезистентність та некультивуємі форми».

**Розроблення діагностичної тест-системи «*Campylobacter spp.* – ПЛР-ТЕСТ».** Наступним етапом досліджень було розроблення засобу для виявлення ДНК *Campylobacter spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції. Підбрано олігонуклеотидні праймери, що синтезують фрагмент гену, кодуєчого консервативний, спільний для всіх *Campylobacter spp.* (табл. 13).

Таблиця 13

### Нуклеатиді послідовності праймерів для детекції *Campylobacter spp.*

Позначення	Нуклеотидна послідовність
16SCampF1	5'-TGTCGTCAGCTCGTGTCCGTG -3'
16SCampR2	5'-CGTATTCACCGTAGCATGGC -3'

У дослідженнях специфічності та чутливості розробленої тест-системи використовували вивчену колекцію штамів *Campylobacter spp.* Тест-система забезпечує детекцію ДНК *Campylobacter spp.* в активному стані та у формах, які втратили здатність до вегетації *in vitro*, у зразках із мінімальною концентрацією збудника  $1 \times 10^2$  КУО/см<sup>3</sup>.

За результатами державних комісійних випробувань проведено процедуру державної реєстрації в Україні «Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій виду *Campylobacter spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Campylobacter spp.* – ПЛР-тест», РП «ВВ-00687-06-14» від 01.07.2014 р.

**Вивчення біологічних властивостей *Escherichia coli* та розроблення засобу детекції шигатоксинпродукуючих *E. coli*.** Наступним етапом досліджень було розроблення та апробація способу для індикації шигатоксинпродукуючих *E. coli*. Для індикації ДНК шигатоксинуотворюючих генів (*stx1* і *stx2*) *Escherichia coli* методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі було підібрано шість штучно синтезованих олігонуклеотидних праймерів, які багаторазово копіюють специфічні ділянки ДНК інфекційного агента за певних температурних, часових параметрів та кількості циклів (табл. 14).

Таблиця 14

**Нуклеотидні послідовності праймерів для детекції *stx1/stx2 E. coli* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі**

Позначення	Нуклеотидна послідовність
STX1 FOR	5'-TACCAGGGCTTACGTTGGTC-3'
STX1 REV	5'-AACCGAACAAACAGCAAAGG-3'
STX1 PROBE	5'-FAM-CACGGTAAGGCGCAATAATT-BHQ1-3'
STX2 FOR	5'-CCGCTTTCTTTACTGCGTTC-3'
STX2 REV	5'-CGCTGGAAGGTGAAGAGTTC-3'
STX2 PROBE	5'-VIC-AACTGTGTTCTGTTTGGC-BHQ1-3'

Під час визначення специфічності способу в якості позитивних та негативних контролів було використано штами *E. coli* 0157, 688 (O26:K29), 4 (Att25), 866 (O26:K99), 957 (O9:K99), 987, 64 ліофілізовані у 2006 р., культура 723 (O138:K81) – у 2010 р. Штами *E. coli* 0157, 688 (O26:K29), 866 (O26:K99), 957 (O9:K99), 987, 64 патогенні для білих мишей ( $2-5 \times 10^8$  КУО), вегетативна форма *E. coli* 4 не патогенна для лабораторних тварин.

Результати ПЛР-аналізу в реальному часі зі специфічними праймерами для виявлення *stx1* та *stx2* показали наявність *stx2* у штамів 688, 723, 64. Вказані штами патогенні для білих мишей та не втратили патогенності у процесі ліофілізації та тривалого (10 та 6 років) зберігання в ліофільному стані, відносяться до серотипів O2, O138, мають адгезивні антигени відповідно F41, K81. Штам 0157, який був патогенним для білих мишей до ліофілізації, в процесі ліофілізації та тривалого зберігання в ліофільному стані втратив патогенність; *stx1* та *stx2* фактори методом полімеразної ланцюгової реакції у даного штаму не виявлено.

З гетерологічними зразками інших видів ентеробактерій (*S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*) та бактеріями інших родів (*P. multocida*, *St. aureus*, *Rhodococcus equi*, *Bac. subtilis*) перехресних реакцій у разі постановки ПЛР-аналізу з випробовуваними праймерами не виявлено. Результати проведених досліджень було використано під час розроблення та оформлення патенту на корисну модель «Спосіб ідентифікації шиготоксинутворюючих (*stx1/stx2*) *Escherichia coli* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі».

**Вивчення поширення антибіотикорезистентності у культур, виділених під час проведення мікробіологічних досліджень біологічного матеріалу від тварин, харчових продуктів та об'єктів довкілля.** Ізоляти *E. coli*, виділені із внутрішніх органів загиблих курей (60 культур) та з яєць (жовтки та змиви, 20 культур) були нечутливими до пеніцилінів, цефалоспоринів, хінолонів, нітрофуранів у 100 % випадків, лінкозамідів, 15 % культур проявляли чутливість до хлорамфеніколу, 30 % – до азитроміцину із групи макролідів, 50 % – до гентаміцину, 80 % – до сізоміцину із групи аміноглікозидів. Резистентність культур до пеніцилінів, цефалоспоринів та фторхінолонів супроводжувалася високим відсотком дисоціації культур. Реєстрували 25 % культур із граничними значеннями діаметрів зон інгібіції росту, які віднесено до малочутливих та 45,7 % культур з ознаками дисоціації у разі взаємодії з антибіотиками (табл. 15).

Таблиця 15

### Чутливість ізолятів *E. coli* до антибіотиків (n=60)

Антибіотик, мкг (ОД)	Проби з яєць (n=20)				Змиви/послід (n=20/20)			
	ч	м/ч	р	д, %	ч	м/ч	р	д, %
карбеніцилін, 25	0	50	50	85*/15Δ=100	0	100	0	0
тикарцилін 75	0	0	100	50*/50Δ=100	0	100	0	0
Тіс./Clavul. acid 75/10	0	50	50	50*/50Δ=100	50	50	0	0
цефуроксим, 30	0	15	85	100*	0	0	100	0
цефепім, 30	0	20	80	15*	0	50	50	0
стрептоміцин, 30	0	15	85	0	50	50	0	0
канаміцин, 30	0	0	100	15*	0	0	100	0
неоміцин, 30	0	85	15	20*	50	50	0	50*
гентаміцин, 10	50	50	0	30*	50	50	0	50*
сізоміцин, 10	80	10	10	20*	50	50	0	50*
еритроміцин, 15	0	20	80	10*	50	50	0	0
азитроміцин, 15	30	35	35	20*	50	50	0	0
левофлоксацин, 5	0	85	15	15*/15=30	0	0	100	50*
спарфлоксацин, 5	0	40	60	15*	0	50	50	50*
фуразолідон, 300	0	0	100	0	0	0	100	0
хлорамфенікол, 30	15	85	0	15*	50	50	0	0

Примітка. «р» – резистентні; «ч» – чутливі; «м/ч» – малочутливі; «д» – дисоціація; \* – резистентні колонії в зоні інгібіції; «Δ» – утворення подвійних та потрійних зон інгібіції.

Більшість *E. coli*, виділених з обладнання (20 культур) та змивів (20 культур) були не чутливі до антибактеріальних препаратів; 50 % – чутливі до тикарциліну з клавулановою кислотою, стрептоміцину, неоміцину, гентаміцину, сізоміцину, азітроміцину, еритроміцину, хлорамфеніколу. Було також зареєстровано 43,3 % культур із граничними значеннями діаметрів зон інгібіції росту, які віднесено до малочутливих та 17,8 % культур з ознаками дисоціації за взаємодії з антибіотиками. Встановлено, що 100 % досліджених ешерихій не чутливі до нітрофуранів, які природно активні відносно *E. coli* та до яких рідко розвивається лікарська резистентність мікроорганізмів.

Під час дослідження 67 зразків біологічного матеріалу від домашніх птахів виділено 26 культур *S. gallinarum*, 10 культур *S. pullorum* та 36 культур *E. coli*. Культури *S. gallinarum* виділяли із трупів курчат та дорослої птиці; культури *S. pullorum* – від клінічно здорових курчат та зі змивів поверхонь яєць. Культурально-морфологічні, ферментативні та антигенні властивості виділених культур *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *E. coli* відповідали видовим ознакам. Виділені культури проявляли резистентність по відношенню до природних, напівсинтетичних та інгібіторзахищених пеніцилінів, цефалоспоринів I–IV поколінь, карбопенемів, аміноглікозидів, тетрациклінів, макролідів; лінкозамідів, хінолонів I–IV поколінь, нітрофуранів (табл. 16).

Таблиця 16

#### Діапазони діаметрів інгібіції росту культур, мм

Антибіотик	Діаметри інгібіції росту культур, мм		
	<i>S. gallinarum</i> (n=26)	<i>S. pullorum</i> (n=10)	<i>E. coli</i> (n=36)
Ампіцилін	22/0–30/0	21/0–25/0	21/0–20
Амоксицилін	15–21*	13–20*	17–20*
Ампіцилін/сульбактам	20/0–22*	19/0–20*	17/0–11
Тикарцилін/клавуланова к-та	24/10/0–11□	23/9/0–10□	9/0–24*
Цефтриаксон (III)	0–28/11/0□	0–25/10/0□	0–28/10/0
Цефепім (IV)	23/0–26*	22/0–23*	21/0–25*
Іміпенем	0–22/0	0–18/0	11–21*
Меропенем	22/0–10	0–19/0	10–21*
Тетрациклін	0–20*	0–16*	0–20*
Доксицилін	16/0–20*	17/0–9*	14/0–19*
Спарфлоксацин (III)	14*–15	11*–13	13*–16
Гатифлоксацин (IV)	12*–15	13*–15	11*–17
Фуразолідон	0–15/0*	0–14/0	0–14/0
Хлорамфенікол	0–26/18 (70 %)	0–24/15 (70%)	0–26/18 (70 %)

Примітка. «□» – стимуляція росту культури навколо зони інгібіції; «\*» – ріст резистентних колоній по всій зоні інгібіції; «20/12» – суцільний ріст резистентних колоній у проміжку діаметрів зони інгібіції від 20 до 12 мм

До хлорамфеніколу резистентність проявляли 30 % виділених культур; 70 % культур, виділених із трупів загинувших від гострої кишкової інфекції курчат та курчат-бройлерів, проявляли помірну стійкість. Серед виділених культур 22,2 % ентеробактерій виявилися чутливими до амоксициліну, між тим

до ампіциліну, який рекомендований EUCAST (версія 8) для скрінінгу чутливості ентеробактерій до амоксициліну культури були нечутливі.

Відмічалось співпадіння рівня чутливості *Salmonella spp.* та *E. coli*, виділених з одного об'єкту до антибіотиків, що може вказувати на перехресну набуту резистентність ентеробактерій різних видів у межах одного макроорганізму (птиця)/об'єкту (яйця курячі). Набута до природних інгібіторів (пеніциліни, цефалоспорини, карбопенемі, хінолони, хлорамфенікол) резистентність у досліджуваних ентеробактерій супроводжувалася значною дисоціацією популяцій. Це проявлялося стимуляцією росту культур навколо зон інгібіції, суцільним або щільним ростом резистентних колоній у зонах інгібіції, утворенням потрійних та подвійних зон інгібіції росту культур із суцільним ростом резистентних колоній.

### **Вивчення особливостей взаємодії бактерій з наночастинками металів.**

Одним із перспективних напрямів у пошуку альтернативних антимікробних препаратів є застосування наночасток металів. Вивчено вплив *in vitro* наночастинок Ауруму розміром 10 нм, 20, 30, 45 нм у п'яти концентраціях за металом: 1,1 мкг/мл; 1,38; 2,77; 5,53; 11,06 мкг/мл з штамами *E. coli*. За культивування отриманих композицій наночастинок зі штамами *E. coli* Г 35-№ 1, 2, 3-413 встановлено, що внесення в рідкі поживні середовища наночастинок середнього розміру (20 та 30 нм) сприяє підвищенню накопичення біомаси порівняно з контролем у середньому відповідно на 22,5 %, 24,4 і 25,1 % та 19,1 %, 21,5 і 24,1 %. За культивування штамів *E. coli* з додаванням наночастинок Ауруму розміром 10 нм у концентрації 2,77 мкг/мл і 45 нм у концентрації 1,38 мкг/мл значення показника КУО/см<sup>3</sup> знижувалися відповідно на 11,5 та 10,7 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з контролем.

Під час визначення впливу колоїдного Ауруму розміром 30 нм із концентрацією за металом 19 мкг/мл на рівень накопичення бактеріальної маси *Bac. anthracis Sterne 34F2* у бульйоні Хоттінгера встановлено, що вміст дослідженого зразку наночастинок Ауруму з кінцевою концентрацією в середовищі культивування  $1,9 \times 10^{-3}$  та  $2,38 \times 10^{-3}$  г/л призводить до підвищення рівня накопичення біомаси *Bac. anthracis* порівняно з контрольним середовищем відповідно на 2 та 6 логарифмів.

За вивчення впливу нанопрепаратів Бісмуту розміром 40 нм у концентраціях 15,5 мг/мл, 13,9 та 77,5 мг/мл за металом на бактеріальні клітини встановлено виражену інгібуючу дію препарату із вмістом 77,5 мг/мл за металом у кінцевих концентраціях 6,5 та 12,9 мг/мл на тест-штами *Listeria*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia* (за концентрації інокулюму –  $10^3$  КУО/см<sup>3</sup>,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  КУО/см<sup>3</sup>), на тест-штам *Bac. anthracis* М-71 (за концентрації інокулюму  $10^7$  КУО/см<sup>3</sup>).

## **ВИСНОВКИ**

У дисертації досліджено біологічні властивості бактерій – збудників харчових зоонозів. Наведено нові дані стосовно особливостей їх внутрішньородової диференціації за умови *S-R*-дисоціації, *L*-трансформації

сферопластного та протопластного типів, водночас охарактеризовано зміни культурально-морфологічних, ферментативних, антигенних властивостей, патогенності та чутливості до антибактеріальних препаратів, при цьому. Встановлено ефективність використання методу полімеразної ланцюгової реакції для детекції збудників у вегетуючих та невегетуючих форм, *L*-форм сферопластного та протопластного типів бактерій.

1. У результаті вивчення біологічних властивостей *Salmonella spp.* (*S. cholerae suis*, *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. Enteritidis*) встановлено, що штами *S. cholerae suis* виявилися менш вірулентними для білих мишей (на 1 lg), ніж культури інших сероваріантів. У 100 % випадків *Salmonella spp.* високочутливі до карбопенемів та нечутливі до бензилпеніциліну. Встановлено особливості чутливості *Salmonella spp.* у межах серотипу до препаратів: із групи пеніцилінів – *S. typhimurium* чутливі до ампіциліну та піперациліну; із групи цефалоспоринів I–IV поколінь – чутливі *S. Typhimurium*; із групи цефалоспоринів III покоління – чутливі *S. cholerae suis*, *S. dublin*, *S. enteritidis*; із групи хінолонів – чутливі *S. cholerae suis* (за виключенням флоксацину) та *S. typhimurium*; до хлорамфеніколу – чутливі *S. dublin* та *S. enteritidis*; до рифампіцину – чутливі *S. cholerae suis*; до поліміксину В – чутливі *S. typhimurium*.

2. У *R*-, *L*-форм *Salmonella spp.* значно знижується або втрачається ферментативна активність, аглютинабельність, патогенність; відбуваються зміни у чутливості дисоціантів до антибактеріальних препаратів: вектор змін залежить від біологічних властивостей штамів, притаманних відповідному їм серотипу, виду мінливості (*R*-, *L-B L-A*) та особливостей фармакологічної дії групи препаратів. Пасажи через організм білих мишей не призводили до реверсії *R*-дисоціантів в *S*-форму.

3. Доведено ефективність «Набору антигенів для діагностики сальмонельозів тварин (груп В, D)»: антиген є активним у титрі 1:4. Доведено ефективність засобу для індикації ДНК *Salmonella spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, який забезпечує виявлення ДНК *Salmonella spp.* у зразках із мінімальною концентрацією збудника  $1 \times 10^1$  КУО/см<sup>3</sup> та забезпечує детекцію ДНК *L*-форм бактерій сферопластного та протопластного типів.

4. Вивчено біологічні особливості *Yersinia spp.*, серед досліджених культур 4 належать до *Y. enterocolitica* біотипу 1В, серотипу O:8. Встановлено особливості чутливості до антибактеріальних препаратів: *Y. pseudotuberculosis* у 100 % випадків чутливі до цефалоспоринів (I–IV поколінь), карбопенемів, напівсинтетичних пеніцилінів, тетрациклінів, аміноглікозидів (I–III поколінь), хінолонів (I–III поколінь), хлорамфеніколу, фурадоніну; більшість *Y. enterocolitica* чутливі до піперациліну, цефалоспоринів III покоління, карбопенемів, фторхінолонів II–III поколінь, аміноглікозидів II покоління. У разі культивування за температури 37 °C 100 % культур *Y. pseudotuberculosis* та до 30 % *Y. enterocolitica* дисоціюють у *R*-форму, що супроводжується відповідними змінами їх біологічних властивостей. У дисоціантів *Y. pseudotuberculosis* підвищується чутливість до пеніцилінів, цефалоспоринів,

карбопенемів, тетрациклінів, до препаратів інших груп реєструється різноспрямована зміна чутливості.

5. Доведено ефективність «Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій виду *Yersinia enterocolitica* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Yersinia enterocolitica* – ПЛР-Тест», який забезпечує виділення ДНК *Y. enterocolitica*, зокрема індикацію *Y. enterocolitica*, які втратили здатність до вегетації *in vitro*, поріг чутливості засобу забезпечує детекцію ДНК у зразках із мінімальною концентрацією збудника  $1 \times 10^2$  КУО/см<sup>3</sup>.

6. Встановлено, високу патогенність досліджених *P. multocida* для гризунів, DL<sub>100</sub> штамів *P. multocida* 550 та *Smoll* для білих мишей становить  $0,5 \times 10^1$  КУО. *P. multocida* чутливі до хлорамфеніколу (100 %), пеніцилінів (77,8 %), карбопенемів (83,33 %), аміноглікозидів (82,5 %), хінолонів (73,8 %). Визначено, що рекомендовані EUCAST скринінги чутливості *P. multocida* до: доксицикліну за тетрацикліном негативні у 75 % культур; до фторхінолонів за тестом із налідиксовою кислотою негативні у 66,7 % випадків, до левофлоксацину – у 80 % культур, що є підставою для вдосконалення чинних рекомендацій. Встановлено, що у процесі S-, R-дисоціації штами *P. multocida* знижують ферментативну активність, втрачають вірулентність, набувають резистентності до пеніцилінів, більшості цефалоспоринів, макролідів, лінкозамідів, тетрациклінів, аміноглікозидів; набувають чутливості до більшості хінолонів та окремих цефалоспоринів; двократні пасажі через організм білих мишей не призвели до реверсії штамів *P. multocida* S-форму.

7. За результатами вивчення біологічних властивостей *Listeria spp.* відібрано штами з референтними властивостями для використання у виробництві засобів діагностики лістеріозу. Встановлено, що культури *Listeria spp.* чутливі до пеніцилінів, не чутливі до цефалоспоринів, карбопенемів, поліміксину. Визначено видові особливості чутливості до антибіотиків видів *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. innocua*. Встановлено, що з переходом *Listeria spp.* до L-форм відмічається зниження рівня ферментативної активності, втрата гемолітичних властивостей; набувається стійкість до більшості антибактеріальних препаратів.

8. Доведено ефективність тест-системи «*Listeria spp.* – ПЛР-Тест»: засіб забезпечує виявлення ДНК *Listeria spp.*, у тому числі форм, які втратили здатність до вегетації *in vitro* та дає можливість виявляти ДНК L-форм сферопластного та протопластного типів *Listeria spp.* у зразках із мінімальною концентрацією збудника  $1 \times 10^2$  КУО/см<sup>3</sup>. Визначено ефективність засобу для виявлення ДНК бактерій *L. monocytogenes* методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Засіб забезпечує детекцію ДНК L-форм *L. monocytogenes* сферопластного та протопластного типів у зразках із мінімальною концентрацією збудника  $1 \times 10^1$  КУО/см<sup>3</sup>.

9. Вивчено біологічні особливості термофільних кампілобактерій (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*), встановлено, що за зниження температури культивування (25 °C) вони втрачають здатність до вегетації. На підставі вивчення чутливості до антибіотиків встановлено, що селективна добавка із

вмістом гентаміцину сульфату, цефалексину та рифампіцину забезпечує селективну ізоляцію мікроорганізмів роду *Campylobacter spp.*, пригнічуючи ріст супутньої мікрофлори (*E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocitogenes*, *P. multocida*, *St. aureus*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*).

10. Доведено ефективність запропонованого захисного середовища, яке забезпечує виживання 45,71 % клітин у процесі ліофілізації, та 6,77 % клітин після 12 місяців зберігання культур у ліофільному стані. Доведено ефективність тест-системи «*Campylobacter spp.* – ПЛР-Тест», яка забезпечує індикацію ДНК *Campylobacter spp.*, у тому числі форм, які втратили здатність до вегетації *in vitro* у зразках із мінімальною концентрацією збудника  $1 \times 10^2$  КУО/см<sup>3</sup>.

12. Встановлено, що рівень поширення резистентних до β-лактамів, хінолінів та нітрофуранів представників родини *Enterobacteriaceae*, виділених від птиці за умов господарств промислового типу та з об'єктів ветеринарно-санітарного нагляду сягає 100 %; 85 % культур, виділених від поголів'я та 50 % культур, виділених з об'єктів ветеринарно-санітарного нагляду резистентні до хлорамфеніколу.

13. Встановлено, що виділені у випадках сальмонельозу у приватних птахогосподарствах *Salmonella spp.* та *E. coli* резистентні до β-лактамів, аміноглікозидів, тетрациклінів, макролідів, лінкозамідів, хінолонів, нітрофуранів. До хлорамфеніколу резистентні 30 % ізолятів; 70% культур проявляли помірну стійкість. 22,2 % ізолятів чутливі до амоксициліну, водночас до ампіциліну, який рекомендований EUCAST (версія 8) для скринінгу чутливості ентеробактерій до амоксициліну, ізоляти нечутливі. Встановлено 100 % набуту перехресну резистентність ентеробактерій різних видів у межах одного макроорганізму (птиця)/об'єкту (яйця курячі).

11. Доведено ефективність «Способу ідентифікації шиготоксинутворюючих (*stx1/stx2*) *Escherichia coli* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі», який забезпечує детекцію *stx2 E. coli*.

14. Встановлено стимулюючу дію наночастинок Ауруму (20 нм, 30 нм) у кінцевій концентрації 1,16 та 2,59 мкг/мл за металом на ростові властивості *E. coli*; наночастинок Ауруму (30 нм) у кінцевій концентрації  $19 \pm 2$  мкг/мл на ростові властивості *Bac. anthracis*.

15. Встановлено інгібуючу дію наночастинок Ауруму (10 нм) у концентрації 2,77 мкг/мл та наночастинок Ауруму (45 нм) у кінцевій концентрації 1,38 мкг/мл на ростові властивості *E. coli* та інгібуючу дію нанопрепаратів Бісмуту (40 нм) 77,5 мг/мл за металом у кінцевих концентраціях 6,5 та 12,9 мг/мл на *Listeria spp.*, *Campylobacter spp.*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Y. enterocolitica*, *Bac. anthracis*.

16. Експериментально обґрунтовано доцільність проведення комплексних лабораторних досліджень під час діагностики бактеріальних харчових зоонозів із використанням мікробіологічних та молекулярно-генетичних методів досліджень.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Розроблено паспорти та проведено депонування штамів *L. monocytogenes 4b* (П), *L. monocytogenes 1/2 в* (П), *L. monocytogenes 1/2 а* (П), *L. ivanovii 0811 i*, *L. seeligeri 0811 s*, *L. welshimeri 0313 w*, *L. grayi 0811 g*, *L. murray 0811 m*, *Campylobacter jejuni 3C-08/12*, *Y. enterocolitica*, *Y. Pseudotuberculosis*.

2. Результати досліджень стали науковим підґрунтям для державної реєстрації в Україні: набору антигенів для діагностики сальмонельозів тварин, РП «ВВ-00189-06-10» від 24.03.2010 р.; набору тест-штамів *Listeria spp.* для проведення САМР-test та контролю якості поживних середовищ, РП «ВВ-00544-06-13» від 11.04.2013 р.; діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Listeria spp.* – ПЛР-Тест», РП «ВВ-00643-06-13» від 11.04.2013 р.; діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій виду *Yersinia enterocolitica* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Yersinia enterocolitica* – ПЛР-Тест», РП «ВВ-00678-06-14» від 03.04.2014 р.; діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій виду *Campylobacter spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Campylobacter spp.* – ПЛР-Тест», РП «ВВ-00687-06-14» від 01.07.2014 р.

3. Науковим співробітникам, працівникам науково-дослідних лабораторій використовувати деклараційні патенти України на корисні моделі під час проведення діагностичних досліджень: «Засіб для диференційної діагностики лістеріозу бактеріологічним методом та для оцінки якості поживних середовищ для культивування»; «Спосіб виявлення ДНК *Yersinia enterocolitica* за допомогою напівгніздового методу полімеразної ланцюгової реакції»; «Спосіб індикації *Salmonella spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі»; «Спосіб ідентифікації шиготоксинутворюючих (*stx1/stx2*) *Escherichia coli* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі».

4. Результати наукових досліджень, отримані під час виконання дисертації, лягли в основу методичних та науково-практичних рекомендацій і використовуються під час підготовки спеціалістів напряму «Ветеринарна медицина» у закладах вищої освіти України.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Ушкалов В. О., **Виговська Л. М.** Особливості довгострокового зберігання бактерій виду *Listeria monocytogenes*. Міжвідомчий тематичний науковий збірник Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН». 2009. Вип. 92. С. 503–505 (Здобувачем виконано дослідження біологічних властивостей штаму *Listeria monocytogenes* до та після ліофілізації, здійснено статистичну обробку та порівняльний аналіз одержаних даних та сформульовано висновки).

2. Ушкалов В. О., Акименко Л. І., **Виговська Л. М.**, Похил С. І. Вивчення біологічних властивостей штамів *Listeria monocytogenes*. Науково-технічний

бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. 2009. Вип. 10. № 3. С. 367–372. (Здобувачем виконано дослідження біологічних властивостей штамів *Listeria monocytogenes* серотипів 1/2 А, 4В, 3А, здійснено статистичну обробку та порівняльний аналіз одержаних даних, сформульовано висновки).

3. Ушкалов В. О., **Виговська Л. М.**, Резніченко Л. С., Романько М. Є., Грузіна Т. Г. Методичні підходи обґрунтування біобезпечності наночастинок металів у складі пробіотичних препаратів. Міжвідомчий тематичний науковий збірник Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН». 2010. Вип. 94. С. 357–362. (Здобувачем визначено антагоністичну активність штамів *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, пробіотичних препаратів на основі зазначених штамів та препарату, що додатково містить наночастилки золота).

4. Кюрчев О. М., Ушкалов В. О., **Виговська Л. М.**, Касяненко О. І. Ефективність селективних домішок до поживних середовищ для ізоляції термостабільних кампілобактерій. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. 2011. Вип. 12. № 3–4. С. 376–380. (Здобувачем виконано дослідження антимікробної дії селективних домішок на штами мікроорганізмів, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформульовано висновки).

5. Виговська Л. М. Вивчення антибіотикорезистентності штамів *Pasteurella multocida*, патогенних для кролів. Ветеринарна біотехнологія. 2011. № 18. С. 27–33.

6. Виговська Л. М. Вивчення біологічних властивостей штаму *Pasteurella multocida* «Смол» за умови S-R-дисоціації. Міжвідомчий тематичний науковий збірник Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН». 2011. Вип. 95. С. 93–95.

7. Ушкалов В. О., **Виговська Л. М.**, Пустовіт Н. А., Панікар І. І., Скрипка М. В., Заріцька А. О. Вивчення патогенних властивостей штаму *Pasteurella multocida*. Вісник Житомирського національного агроекологічного університету. 2012. № 1 (32). Т. 3. Ч. 1. С. 243–249. (Здобувачем виконано дослідження патогенних штамів *Pasteurella multocida* 550, здійснено аналіз одержаних результатів).

8. Ушкалов А. В., **Виговська Л. М.**, Пустовіт Н. А., Поліщук Н. М. Вивчення біологічних властивостей бактерій роду *Yersinia*, виділених з об'єктів ветеринарно-санітарного нагляду. Міжвідомчий тематичний науковий збірник Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН». 2012. Вип. 96. С. 130–134. (Здобувачем виконано дослідження біологічних властивостей, чутливості до антибіотиків штамів *Yersinia enterocolitica*, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформульовано висновки).

9. Головка А. М., Ушкалов А. В., **Виговська Л. М.** Порівняльне вивчення біологічних властивостей та чутливості до антибіотиків бактерій роду *Yersinia*.

Ветеринарна біотехнологія. 2012. № 21. С. 206–214. (Здобувачем виконано дослідження культурально-мофологічних, антигенних властивостей, чутливості до антибіотиків штамів *Yersinia enterocolitica*, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформульовано висновки).

10. Ковтун В. А., Ушкалов В. О., **Виговська Л. М.** Порівняльне вивчення ізолятів роду *Listeria* з референтними штамами бельгійської колекції культур. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. 2012. Вип. 14. № 1–2. С. 601–607. (Здобувачем проведено огляд наукових джерел з проблеми досліджень, виконано дослідження референтних штамів *Listeria spp.*, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних).

11. Ковтун В. А., Ушкалов В. О., **Виговська Л. М.**, Мачуський О. В. Конструювання захисного середовища для ліофілізації бактерій роду *Listeria*. Ветеринарна біотехнологія. 2013. № 22. С. 224–232. (Здобувачем проведено огляд наукових джерел з проблеми досліджень, досліджено культуральні та гемолітичні властивості штаму *Listeria ivanovii* 0811i до та після ліофілізації, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних).

12. Виговська Л. М. Вивчення біологічних властивостей штамів *Yersinia pseudotuberculosis*. Ветеринарна біотехнологія. 2013. № 23. С. 31–34.

13. Ушкалов В. О., Самкова О. П., Данчук В. В., **Виговська Л. М.**, Дробовіч І. М., Колесникова Т. П. Експертні дослідження в Українській лабораторії якості та безпеки продукції АПК. Аграрний вісник Причорномор'я. Ветеринарні науки. 2017. Вип. 83. С. 275–279. (Здобувачем мікробіологічними методами виділено штами родини *Enterobacteriaceae*, визначено чутливість їх до антибіотиків, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних).

14. Виговська Л. М. Вивчення біологічних властивостей епізоотичних штамів *Salmonella spp.* Ветеринарна біотехнологія. 2018. Вип. 32 (1). С. 70–78.

### Статті у наукових фахових виданнях України,

#### включених до міжнародних наукометричних баз даних:

15. Дерябін О. М., Пустовіт Н. А., **Виговська Л. М.** Розробка ПЛР-ТЕСТ-системи «*Campylobacter spp.* – ПЛР-ТЕСТ» для виявлення та ідентифікації ДНК бактерій роду *Campylobacter*. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. 2014. Вип. 15. № 2–3. С. 278–281. (Здобувачем проведено огляд наукових джерел з проблеми досліджень, вивчено біологічні властивості штамів *Campylobacter spp.*, встановлено маркерні гени, за якими було підібрано специфічні олігонуклеотидні праймери до *Campylobacter spp.*, підібрано позитивні та контрольний штами *Campylobacter jejuni* та негативні контрольні штами, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних).

16. Ушкалов А. В., **Виговська Л. М.**, Мачуський О. В., Дерябін О. М., Бортнічук В. А. Виявлення ознак патогенності у штамів *Yersinia pseudotuberculosis*. Міжвідомчий тематичний науковий збірник Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної

медицини УААН». 2015. Вип. 100. С. 82–84. (Здобувачем взято участь у постановці дермонекротичної та кератокон'юнктивальної проби на мурчаках зі штамми *Y. pseudotuberculosis*, бактеріологічних дослідження патологічного матеріалу, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних).

17. Головка А. М., Ушкалов А. В., **Виговська Л. М.**, Ковтун В. А. Вивчення впливу захисного середовища з аеросилом у процесі ліофілізації та зберігання на досліджувані культури *Yersinia spp.* Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. 2015. Вип. 16. № 2. С. 188–193. (Здобувачем виконано дослідження біологічних властивостей штамів *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* до та після ліофілізації, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформовано висновки).

18. Vygovska L. M. Determination of antibiotic susceptibility of *Listeria spp.* Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety. 2018. Vol. 4. Issue 2. P. 5–9.

19. Виговська Л. М. Розроблення засобу для виявлення ДНК бактерій виду *Listeria monocytogenes* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2018. № 3 (73). Режим доступу до статті: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/dopovidi2018.03.025/9466>

20. Виговська Л. М. Розроблення засобу для виявлення ДНК бактерій роду *Salmonella* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Міжвідомчий тематичний науковий збірник Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН». 2018. Вип. 104. С. 329–331.

#### Стаття у науковому виданні іншої держави

21. **Выговская Л. Н.**, Похил С. И., Вияшка Т., Змуджинский Ф., Ушкалов В. А. Сравнительная характеристика биологических свойств штаммов *Listeria monocytogenes*. Аграрная наука. 2010. № 5. С. 23–26. (Здобувачем проведено огляд наукових джерел з проблеми досліджень, виконано дослідження біологічних властивостей штамів *Listeria monocytogenes*, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформовано висновки).

#### Патенти України на корисну модель:

22. Ушкалов В. О., Ковтун В. А., Мачуський О. В., **Виговська Л. М.**, Бабкін М. В. Патент України на корисну модель МПК С12Q1/04 (2006.01). Засіб для диференційної діагностики лістеріозу бактеріологічним методом та для оцінки якості поживних середовищ для культивування *Listeria spp.*; заявник і патентовласник Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів; № u201303401; заявлено 20.03.13; опубліковано 27.08.13; Бюл. № 16. (Здобувач брала участь у розробленні принципу корисної моделі, провела експеримент з вивчення та підбору штамів *Listeria spp.*, брала

участь у визначенні специфічності засобу, підготовці матеріалів до патентування).

23. Головка А. М., Ушкалов А. В., Дерябін О. М., **Виговська Л. М.**, Мачуський О. В., Поліщук Н. М. Патент України на корисну модель МПК А61К31/00, С12Q1/00 (2015.01). Спосіб виявлення ДНК *Yersinia enterocolitica* за допомогою напівгніздового методу полімеразної ланцюгової реакції; заявник і патентовласник Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів; № uA103102; заявлено 24.02.2015; опубліковано 10.12.2015; Бюл. № 23. (*Здобувач брала участь у вивченні біологічних властивостей Yersinia spp., встановила маркерні гени, за якими було підібрано специфічні олігонуклеотидні праймери до Y. enterocolitica*).

24. Ушкалов В. О., Спиридонов В. Г., **Виговська Л. М.**, Мачуський О. В., Іщенко Л. М., Новгородова О. Ю., Стародуб М. Ф., Мазур Т. В. Патент України на корисну модель 115440. МПК С12Q 1/12 (2006.01). Спосіб індикації *Salmonella spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України; №u201612553; заявлено 09.12.2016; опубліковано 10.04.2017; Бюл. № 7/2017. (*Здобувачем вивчено біологічні властивості Salmonella spp., встановлено маркерні гени, за якими було підібрано специфічні олігонуклеотидні праймери до Salmonella spp., взято участь у визначенні специфічності, чутливості та відтворюваності способу*).

25. Ушкалов В. О., Спиридонов В. Г., **Виговська Л. М.**, Мачуський О. В., Іщенко Л. М., Новгородова О. Ю., Стародуб М. Ф., Мазур Т. В. Патент України на корисну модель МПК С12R 1/19 (2006.01). Спосіб ідентифікації шиготоксинутворюючих (*stx1/stx2*) *Escherichia coli* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України; № 115879; заявлено 09.12.2016; опубліковано 25.04.2017; Бюл. № 8/2017. (*Здобувачем вивчено біологічні властивості Escherichia coli, встановлено маркерні гени, за якими було підібрано специфічні олігонуклеотидні праймери до stx1/stx2, взято участь у визначенні специфічності способу*).

#### Методичні рекомендації:

26. Ушкалов В. О., Чумаченко В. В., Постоєнко В. О., Бабкін М. В., Пінчук Н. Г., Блоцька О. Ф., Годовський О. В., **Виговська Л. М.**, Романенко О. А., Андрущенко В. В., Напненко О. О., Бондаренко К. В. Перелік показників якості для ветеринарних імунобіологічних засобів: [методичні рекомендації]. К., 2011. 8 с. (*Затверджено Науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України, протокол № 1 від 23 грудня 2010 р. Здобувач брала участь в опрацюванні Спеціальних вимог до вакцин живих бактеріальних, вакцин інактивованих, діагностикумів, написанні та оформленні рекомендацій*).

27. Мельничук С. Д., Скибіцький В. Г., Козловська Г. В., Мартиненко Д. Л., Ібатулліна Ф. Ж., Ушкалов А. В., **Виговська Л. М.** Методичні рекомендації з лабораторної діагностики кишкового ієрсиніозу

тварин, виявлення *Yersinia enterocolitica* у харчових продуктах, кормах для тварин та об'єктах довкілля. К., 2013. 36 с. (Затверджено Науково-технічною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби Міністерства аграрної політики України, протокол № 1 від 21 грудня 2012 р. Здобувачем взято участь в опрацюванні нормативної бази, що регламентує виділення *Y. enterocolitica*, написанні та оформленні рекомендацій).

28. **Виговська Л. М.**, Ушкалов В. О., Данчук В. В., Колеснікова Т. П. Термофільні кампілобактерії: методи виявлення, диференціації, антибіотикорезистентність та некультивуємі форми: [методичні рекомендації]. К., 2017. 26 с. (Затверджено вченою радою Української лабораторії якості і безпеки продукції агропромислового комплексу, протокол № 13 від 06 листопада 2017 р. Здобувачем виконано аналіз нормативної бази, що регламентує виділення термофільних кампілобактерій, здійснено підбір складових поживних середовищ, мікробіологічні дослідження, написано та оформлено методичні рекомендації).

#### Тези наукових доповідей:

29. Ушкалов В. О., **Виговська Л. М.** Дослідження антибіотикорезистентності штамів бактерій роду *Listeria*. XII з'їзд товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського, м. Ужгород, 25–30 травня 2009 року: тези доповідей. Ужгород, 2009. С. 363. (Здобувачем виконано дослідження антибіотикорезистентності штамів *Listeria spp.*, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформульовано висновки).

30. Ушкалов В. О., **Выговская Л. Н.**, Дерябин О. Н., Вяшка Т., Змуджинский Ф. Индикация кампилобактерий и система их мониторинга в продуктах животного происхождения. Микробиологическая биотехнология – наукоёмкое направление современных знаний: Международная научная конференция, г. Кишинев, Республика Молдова, 6–8 июля 2011 года: тезисы доклада. Кишинев, 2011. С. 219. (Здобувачем виконано мікробіологічні дослідження, взято участь у молекулярно-генетичних дослідженнях з визначення специфічності праймерів для індикації термофільних кампілобактерій, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформульовано висновки).

31. Ушкалов В. О., **Выговская Л. Н.**, Дерябин О. Н., Вяшка Т., Змуджинский Ф., Похил С. И. Методы выявления и внутривидовой дифференциации бактерий рода *Listeria*. Микробиологическая биотехнология – наукоёмкое направление современных знаний: Международная научная конференция, г. Кишинев, Республика Молдова, 6–8 июля 2011 года: тезисы доклада. Кишинев, 2011. С. 220. (Здобувачем виконано мікробіологічні дослідження, взято участь у молекулярно-генетичних дослідженнях з визначення специфічності праймерів для індикації *Listeria spp.*, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформульовано висновки).

32. Ушкалов В. О., Головка А. М., **Виговська Л. М.** Моніторинг збудника сальмонельозу – ефективний інструмент попередження спалахів токсикоінфекцій. Актуальні питання сучасного птахівництва: XII Українська

конференція з птахівництва з міжнародною участю, м. Алушта, 19–22 вересня 2011 року: тези доповіді. Х., 2011. С. 301–306. (Здобувачем виконано статистичний аналіз даних епізоотичного моніторингу, сформульовано висновки).

33. Ushkalov V., Machuskyu A., **Vygovska L.** Animal anthrax spore vaccine with nanogold. Conference of research workers in animal diseases, Chicago, 4–6 December 2011. (Здобувачем досліджено *in vitro* вплив наночастинок золота на накопичення бактеріальної маси штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних).

34. Ushkalov V., **Vygovska L.** Comparative characteristics of listeria monocytogenes serotype 4b biological properties. Conference of research workers in animal diseases, Chicago, 4–6 December 2011. (Здобувачем проведено огляд наукових джерел з проблеми досліджень, виконано мікробіологічні дослідження штамів *Listeria monocytogenes*, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформульовано висновки).

35. Кюрчев О. М., **Виговська Л. М.**, Дерябін О. М., Головка А. М., Ушкалов В. О. Розробка тест системи для виявлення ДНК бактерій роду *Campylobacter*. Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпечності харчових продуктів: науково-практична конференція у рамках 5-го Міжнародного форуму «Комплексне забезпечення лабораторій», м. Київ, 26–27 вересня 2012 року: тези доповіді. К., 2012. С. 64–65. (Здобувачем проведено огляд наукових джерел з проблеми досліджень, взято участь у молекулярно-генетичних дослідженнях з визначення специфічності праймерів для індикації *Campylobacter spp.*, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних).

36. Ковтун В. А., **Виговська Л. М.** Шляхи вдосконалення бактеріологічної ідентифікації мікроорганізмів роду *Listeria*. Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпечності харчових продуктів: науково-практична конференція у рамках 5-го Міжнародного форуму «Комплексне забезпечення лабораторій», м. Київ, 26–27 вересня 2012 року: тези доповіді. К., 2012. С. 58–59. (Здобувачем проведено огляд наукових джерел з проблеми досліджень, виконано дослідження референтних та епізоотичних штамів *Listeria spp.*, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних).

37. Golovko A., Ushkalov V., **Vygovska L.** Antimicrobial resistance in *Yersinia Enterocolitica* isolated from objects of veterinary-sanitary control. 113<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology, Denver (Colorado), May 18–21, 2013. P. 199. (Здобувачем проведено огляд наукових джерел з проблеми досліджень, виконано дослідження *Yersinia Enterocolitica*, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформульовано висновки).

38. Ushkalov V., Ushkalov A., **Vygovska L.** Biological properties allocated to Ukraine *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. СБЕР Ukraine Regional One Health Research Symposium and Peer Review Session. Building Ukraine's One Health and Biosurveillance Knowledgebase through the Dissemination of Scientific Findings, Kiev, April 24–28, 2017. P. 124. (Здобувачем

виконано дослідження штамів *Yersinia Enterocolitica* та *Yersinia pseudotuberculosis*, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформульовано висновки).

39. **Vygovska L.**, Ushkalov V. Antibiotics Resistance of *Yersinia pseudotuberculosis*. CBEP Ukraine Regional One Health Research Symposium and Peer Review Session. Building Ukraine's One Health and Biosurveillance Knowledgebase Through the Dissemination of Scientific Findings, Kiev, April 24–28, 2017. P. 87. (Здобувачем виконано дослідження чутливості штамів *Yersinia pseudotuberculosis* до антибіотиків, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформульовано висновки).

40. Виговська Л. М. Вивчення антибіотикорезистентності у *Escherichia coli*. Інфекційний контроль та антимікробна резистентність у галузі громадського здоров'я і ветеринарії: Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, м. Київ, 1 червня 2017 року: тези доповіді. К., 2017. С. 52–54.

41. Виговська Л. М. Вивчення резистентності до антибіотиків штамів *Listeria*. Інфекційний контроль та антимікробна резистентність у галузі громадського здоров'я і ветеринарії: Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, м. Київ, 1 червня 2017 року: тези доповіді. К., 2017. С. 52–54.

42. Ushkalov V., **Vygovska L.**, Danchuk V. Antibiotic Resistance of Field Isolates of *Listeria spp.* ASM/ESCMID Conference on Drug Development to Meet the Challenge of Antimicrobial Resistance, Boston, Massachusetts, September 6–8, 2017. P. 86. (Здобувачем виконано дослідження чутливості штамів *Listeria spp.* до антибіотиків, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформульовано висновки).

43. Ishchenco L., **Vygovska L.**, Kalakailo L., Ushkalov V. Spyrudonov V. Designing of primers for the identification of *Listeria monocytogenes* using real-time polymerase chain reaction and their testing. Third Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Abstract directory, Kiev, April 16–20, 2018. P. 103. (Здобувачем виконано мікробіологічні дослідження, виготовлено зразки для постановки полімеразної ланцюгової реакції, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних).

44. **Vygovska L.**, Ushkalov V. Studing the antibiotic sensitivity of isolates *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* In 2015–2017: Third Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Abstract directory, Kiev, April 16–20, 2018. P. 127. (Здобувачем виконано дослідження чутливості ізолятів до антибіотиків, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних, сформульовано висновки).

45. Ushkalov V., **Vygovska L.** The poultry farm as a source of antibiotic-resistant microorganisms. Studing the antibiotic sensitivity of isolates *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* In 2015–2017: Third Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Abstract directory, Kiev, April 16–20, 2018. P. 188. (Здобувачем виконано мікробіологічні дослідження ізолятів *Escherichia coli* та *Salmonella spp.*, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних).

46. Данчук В. В., Виговська Л. М., Вишован Ю. Ю., Воробйова А. В., Гранат А. В. Ферментативні властивості полірезистентних ентеробактерій. Цілі сталого розвитку III тисячоліття: виклики для університетів – наук про життя: Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 2018 року: тези доповіді. К., 2018. С. 109. (Здобувачем виконано дослідження ферментативних властивостей ізолятів *Enterobacteriaceae*, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних).

## АНОТАЦІЯ

**Виговська Л. М. Біологічні властивості збудників харчових зоонозів та розробка засобів індикації.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2019.

Досліджено біологічні властивості бактерій – збудників харчових зоонозів, охарактеризовано видові ознаки чутливості до антибактеріальних препаратів *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Yersinia spp.*, *P. multocida*, *Campylobacter spp.*

Описано зміни в культурально-морфологічних, ферментативних, антигенних, патогенних властивостях, чутливості до антибактеріальних препаратів за різних видів модифікацій *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *P. multocida*, *Campylobacter spp.*

Охарактеризовано біологічні властивості ізолятів *Salmonella spp* та *E. coli* з набутою множинною резистентністю до антибактеріальних препаратів, встановлено, що 100 % досліджених ізолятів резистентні до нітрофуранів, до яких рідко розвивається лікарська стійкість. Встановлено співпадіння рівня чутливості до певних антибіотиків *Salmonella spp.* та *E. coli*, виділених з одного об'єкту.

Експериментально обґрунтовано необхідність удосконалення системи лабораторної діагностики бактеріальних зоонозів шляхом проведення комплексних досліджень із використанням мікробіологічних та молекулярно-генетичних методів.

Встановлено, що вплив наночастинок Ауруму і Вісмуту на ростові властивості бактерій залежить від розміру наночастинок, їх концентрації у середовищі та біологічних властивостей мікроорганізму.

Результати досліджень стали науковим підґрунтям для розроблення засобів діагностики: Набору антигенів для діагностики сальмонельозів тварин, Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій виду *Yersinia enterocolitica* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Yersinia enterocolitica* – ПЛР-Тест», Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій виду *Campylobacter spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Campylobacter spp.* – ПЛР-Тест», Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Listeria spp.*– ПЛР-Тест», Набору тест-штамів

*Listeria spp.* для проведення CAMP-test та контролю якості поживних середовищ, а також способів індикації *Salmonella spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі» та ідентифікації шиготоксинутворюючих (*stx1/stx2*) *Escherichia coli* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі».

**Ключові слова:** бактерії, біологічні властивості, діагностика, зоонози, резистентність, L-форми, R-форми, полімеразна ланцюгова реакція.

## АННОТАЦІЯ

**Выговская Л. Н. Биологические свойства возбудителей пищевых зоонозов и разработка средств индикации.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни и иммунология». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2019.

В диссертации исследованы биологические свойства бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний животных, потенциальных возбудителей пищевых зоонозов (сальмонеллеза, листериоза, иерсиниоза, пастереллеза, кампилобактериоза, эшерихиоза), установлены особенности их внутривидовой дифференциации, особенности фенотипических проявлений биологических свойств при модификациях различных типов с применением бактериологических, серологических, биологических, молекулярно-биологических методов исследований.

Охарактеризованы видовые признаки чувствительности бактерий (*Salmonella spp.* (серогруппы C1, B, D), *Listeria spp.* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. welshimeri*), *Yersinia spp.* (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*), *P. multocida*, *Campylobacter spp.* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) к антибиотикам и антибактериальным препаратам из групп пенициллинов, цефалоспоринов (I–IV поколений), карбопенемов, аминогликозидов, макролидов, линкозамидов, тетрациклинов, хинолонов, нитрофуранов.

Описаны изменения в культурально-морфологических, ферментативных, антигенных, патогенных свойствах, чувствительности к антибактериальным препаратам грамположительных и грамотрицательных бактерий – возбудителей зоонозов при различных видах модификаций: *Salmonella spp.* – при S-R-диссоциации, L-трансформации сферопластного и протопластного типов; *Listeria spp.* – при L-трансформации сферопластного и протопластного типов; *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *P. multocida* – при S-R-диссоциации; термофильных кампилобактеров – потере способности к вегетации *in vitro*. Установлено, что проявления изменений биологических свойств (культурально-морфологических, ферментативных, антигенных, патогенных, чувствительности к антибактериальным препаратам) у бактерий – потенциальных возбудителей пищевых зоонозов при модификационных изменениях характеризуются общими биологическими закономерностями,

которые происходят в определенной последовательности и зависят от вида микроорганизма и типа изменчивости (*S-R*-диссоциации, *L*-трансформации, утрате способности к вегетации *in vitro*).

Изучено распространение множественной резистентности к антибактериальным препаратам у бактерий, выделенных при проведении микробиологических исследований биологического материала от животных, пищевых продуктов и объектов окружающей среды. Установлено совпадение уровня чувствительности к определенным антибиотикам и антибактериальным препаратам *Salmonella spp.* и *E. coli*, выделенных из одного объекта.

Установлено, что уровень распространения резистентных к  $\beta$ -лактамам, хинолонам и нитрофуранам представителей семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных от птицы в условиях хозяйств промышленного типа достигает 100 %; 85 % культур, выделенных от птицы и 50 % культур, выделенных из объектов ветеринарно-санитарного надзора резистентны к хлорамфениколу.

Охарактеризованы культурально-морфологические, ферментативные и антигенные свойства изолятов *Salmonella spp.* и *E. coli* с приобретенной множественной резистентностью к антибактериальным препаратам, установлено, что 100 % исследованных изолятов резистентны к нитрофуранам, к которым редко развивается лекарственная устойчивость.

Экспериментально обоснована необходимость совершенствования системы лабораторной диагностики бактериальных зоонозов путем проведения комплексных исследований с использованием микробиологических и молекулярно-генетических методов, в частности с целью выявления и дифференциации *R*-форм, *L*-форм сферопластного и протопластного типа, бактерий, утративших способность к вегетации *in vitro*.

Установлено, что влияние наночастиц Аурума и Висмута на ростовые свойства бактерий (*Listeria spp.*, *Campylobacter spp.*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Y. enterocolitica*, *Bac. anthracis*) зависит от размера наночастиц, их концентрации в питательной среде и биологических свойств микроорганизма. Установлено ингибирующее действие наночастиц Аурума (10 нм) в концентрации 2,77 мкг/мл и наночастиц Аурума (45 нм) в конечной концентрации 1,38 мкг/мл на ростовые свойства *E. coli* и ингибирующее действие нанопрепаратов Висмута (40 нм) 77,5 мг/мл за металлом в конечных концентрациях 6,5 и 12,9 мг/мл *Listeria spp.*, *Campylobacter spp.*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Y. enterocolitica*, *Bac. anthracis*.

Результаты исследований стали научным основанием для разработки диагностических средств: Набора антигенов для диагностики сальмонеллезов животных, Диагностического набора для выявления ДНК бактерий вида *Yersinia enterocolitica* методом полимеразной цепной реакции «*Yersinia enterocolitica* – ПЦР-тест», Диагностического набора для выявления ДНК бактерий вида *Campylobacter spp.* методом полимеразной цепной реакции «*Campylobacter spp.* – ПЦР-тест», Диагностического набора для выявления ДНК бактерий рода *Listeria* методом полимеразной цепной реакции «*Listeria spp.* – ПЦР-тест», Набора тест-штаммов *Listeria spp.* для проведения СAMP-test и контроля качества питательных сред, а также способов индикации

*Salmonella* spp. и идентификации шиготоксинпродуцирующих (*stx1/stx2*) *E. coli* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

**Ключевые слова:** бактерии, биологические свойства, диагностика, зоонозы, резистентность, *L*-формы, *R*-формы, полимеразная цепная реакция.

## ANNOTATION

**Vygovska L. M. Biological properties of food zoonotic agents and their indication tools development.** – The Manuscript.

The thesis is for degree of doctorate of veterinary sciences degree for speciality 16.00.03 «Veterinary microbiology, epizootology, infectious diseases and immunology». National University of Life and environmental sciences of Ukraine. Kyiv, 2019.

In the dissertation we studied biological properties of bacterial food-borne zoonoses. The species characteristics of sensitivity to antibacterial preparations *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Yersinia* spp., *R. multocida*, *Campylobacter* spp. have been characterized.

We described the changes in culture-morphological, enzymatic, antigenic, pathogenic properties, sensitivity to antibacterial preparations for various types of modifications *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *P. multocida*, *Campylobacter* spp. We characterized biological properties of *Salmonella* spp and *E. coli* isolates with acquired multiple resistance to antibacterial drugs. We found that 100 % of investigated isolates are resistant to nitrofurantoin, to which drug resistance is rarely developed. There is established a coincidence of the sensitivity level of *Salmonella* spp. and *E. coli* obtained from the same object to certain antibiotics.

The necessity of improving the laboratory diagnosis of bacterial zoonoses by conducting complex studies using microbiological and molecular genetic methods was experimentally grounded.

There is established that the influence of aurum and bismuth nanoparticles on of bacteria growth properties depends on the size of nanoparticles, their concentration in the medium and biological properties of the microorganism.

The results of our research became the scientific basis for the development of diagnostic tools: antigens set for animal salmonellosis diagnosis, a diagnostic kit for the bacterial DNA detection of the species *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction «*Yersinia enterocolitica* – PCR test», a diagnostic kit for the bacterial DNA detection of the species *Campylobacter* spp. the method of polymerase chain reaction «*Campylobacter* spp. – PCR Test», diagnostic kit for the bacterial DNA detection of *Listeria* bacteria by polymerase chain reaction «*Listeria* spp.» – PCR Test, test strains set of *Listeria* spp. for conducting CAMP-test and quality control of nutrient media, as well as methods for indicating «*Salmonella* spp. real-time polymerase chain reaction in real time; and identification of Shiga toxin-producing (*stx1/stx2*) *Escherichia coli* by polymerase chain reaction in real time.»

**Key words:** bacteria, biological properties, diagnosis, zoonoses, resistance, *L*-forms, *R*-forms, polymerase chain reaction.

Підписано до друку 12.02.19  
Ум. друк. арк. 1,9  
Наклад 100 прим.

Формат 60x84\16  
Обл.-вид.арк. 1,9  
Зам. № 190100

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України  
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041  
тел.: 527-81-55



