

может использоваться при производстве ППД-туберкулина для млекопитающих.

Ключевые слова: туберкулез, туберкулин, микобактерии *M. bovis* Valle и AN5.

Holovko V.A., Kassich O.V., Kassich V.U., Kolesnikova K.U., Koshelnik V.H. Tuberculo-protein production of the strain *M. bovis* Valle KMIEV-9K

The main method of aftermortem diagnosis of tuberculosis in animals is the allergic test with the use of PPD-tuberculin for mammals. Preparations for the allergic testing of tuberculosis in animals and birds, including "Tuberculin purified (PPD) for mammals in a standard solution" (TUU 24.00497087.645-2001). They are manufactured by Sumy Biological Factory and used during planned diagnostic tests for tuberculosis in Ukraine. However, it should be noted that the legislative act applied by member countries of the European Union is the Council Directive 97/12/EU from 17th March 1997. According to this document, intravital allergic studies in animals are conducted using tuberculin PPD (Protein purified derivative) or HCSM (Heat-concentrated synthetic-medium tuberculin). According to the EU standards, which were provided by the Institute voor Dierhouderij en Diergenzondheid (ID-DLO), Lelistad, the Netherlands, PPD mammalian tuberculin must have the efficiency of 50 000 CTU/ml and be produced from *M. bovis* AN5 or Valle strains. At the same time "Tuberculin purified (PPD) for mammals in standard solution" TUU 24.00497087.645-2001, produced from «*M. bovis* IECVM-1» strain is used in the similar testing in Ukraine. Therefore the development of national dry purified tuberculin PPD from *M. bovis* «AN5» or «Valle» strains is an urgent task. That is why, the aim of our work was to study the proteinogenic properties of *M. bovis* Valle (modified KMIEV-9K) production strains with further development of national preparations for the allergic diagnosis of tuberculosis in animals that meet the EU requirements. The test series of the purified tuberculin (PPD) for mammals in the standard solution were prepared from the culture filtrate of bovine tuberculosis causative agent *M. bovis*, Valle KMIEV-9K strain, grown in a Sauton's liquid synthetic culture medium. The PPD was obtained by autoclaving (100°C for 3 hours) and separation of bacterial mass; obtaining and sterilization of cultural filtrates (sterilizing filtration); precipitation of protein with trichloroacetic acid solution; reprecipitation with saturated solution of ammonium sulfate; removal of salts through dialysis followed by determining the concentration of protein in 1 cm³ of solution. Determination of the protein mass fraction in a standard tuberculin solution was performed by Kjeldahl method. According to current requirements, the protein mass fraction in tuberculin must be 0,8±0,2 mg/cm³. The mass fraction of protein in the tuberculin series (X) produced from *M. bovis* Valle (modified KMIEV-9K) strain was 0,88±0,3 mg/cm³. Thus, the results of this study show that *M. bovis* Valle (modified KSP) and AN5 strains are technological, highly proteinogenic and can be used for the development, production and implementation as a national tuberculin PPD for mammals, which will meet the EU requirements.

Keywords: tuberculosis, tuberculin, mycobacterium *M. bovis* «Valle».

Дата надходження до редакції: 12.03.2015 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Березовський А.В.

УДК637.075:579.22

ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ БАКТЕРІЙ *CRONOBACTER SPP.* (SAKAZAKII) МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

О.М. Бергілевич, д.вет.н., професор, Сумський національний аграрний університет

В.О. Ушкалов, д.вет.н., професор, чл.-кор. НААН України, завідувач Національного центру штамів мікроорганізмів, Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ)

В.В. Касянчук, д.вет.н., професор, Сумський національний аграрний університет

О.М. Дерябін, завідувач відділу молекулярної біології і імунохімії, Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ)

Є.А. Гришина, аспірант, Сумський національний аграрний університет

В статті наведено результати досліджень, які вперше проведені в Україні щодо можливості ідентифікації бактерій *Cronobacter spp.* (*sakazakii*) методом полімеразної ланцюгової реакції, з використанням гену 16SrRNA. Ізоляти бактерій *Cronobacter spp.* (*sakazakii*) були виділені з сирого молока та об'єктів молочних ферм Сумської області. Серед виділених ізолятів, було вибрано 25 які мали подібні морфологічні, культуральні та біохімічні властивості для проведення ПЛР. В результаті проведеного пошуку та аналізу послідовностей генів з консервативними та варіабельними ділянками у бактерій *Cronobacter spp.* (*sakazakii*), були розроблені кілька пар олігонуклеотидних праймерів, специфічних різним ділянкам гена 16SrRNA. При використанні цих праймерів в ПЛР з ДНК виділених ізолятів були отримані попередні позитивні результати з 20 ізолятами бактерій *Cronobacter spp.* (*sakazakii*)

Вісник Сумського національного аграрного університету

Серія «Ветеринарна медицина», випуск 7 (37), 2015

Згідно отриманих даних, достовірна ідентифікація *Cronobacterspp.(sakazakii)* на даний час можлива лише за умови використання комплексного підходу, що базується на комбінуванні класичних методів дослідження (мікроскопія, культуральні і біохімічні характеристики) з молекулярно-генетичними.

Ключові слова: *Cronobacter spp. (sakazakii)*, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), 16SrRNA, олігонуклеотидні праймери.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Бактерія *Cronobacter spp. (sakazakii)* – це мікроорганізм, який є маловивченим в Україні, проте, він визнаний на міжнародному рівні як небезпечний патоген, що може спричинити важке харчове отруєння та навіть раптову смертність у дітей з ослабленим імунітетом протягом першого року життя. В країнах ЄС та СОТ виявлення та ідентифікація даного мікроорганізму є обов'язковою під час контролю виробництва щодо безпечності сухих молочних сумішей для дитячого харчування [1, 5, 6, 11].

Бактерії *Cronobacter spp. (sakazakii)* належать до колиформних мікроорганізмів з родини *Enterobacteriaceae*, які досить поширені в різних харчових продуктах (сире молоко, молочні продукти (сир, масло, сухе молоко), м'ясо та м'ясні продукти, фрукти, спеції) та об'єктах навколишнього середовища (вода, ґрунт, об'єкти тваринницьких ферм та об'єкти харчових підприємств) [8, 10]. Мікроорганізм добре росте на селективних накопичувальних середовищах для патогенних ентеробактерій, проте його видова ідентифікація пов'язана з певними труднощами. Численні дослідження з біотипування і генотипування 15 біогруп *Enterobactersakazakii*, привели до її подальшої рекласифікації в рід *Cronobacter (Cronobacterspp.)*. На сьогоднішній день рід *Cronobacter* налічує сім різних видів: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, крім того, до цього переліку нещодавно добавлено ще два нових види *C. universalis* і *C. condimentii* [2, 9].

Бактерії *Cronobacter spp. (sakazakii)* мають подібні фенотипічні властивості з іншими бактеріями родини *Enterobacteriaceae (Salmonellaspp., Enterobacter spp. та Escherichiaspp.)* і особливо близько спорідненими є з бактеріями *Enterobactercloacae* та *Enterobacteragglomerans* (інша назва *Pantoea agglomerans*) [2, 9].

Аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми. В Україні розроблені методичні рекомендації, в яких наведено лабораторні методи виділення та підрахунку кількості бактерій *Cronobacter spp. (sakazakii)* в досліджуваних об'єктах, узагальнені дані про морфологію збудника, його культуральні та біохімічні властивості, які гармонізовані з сучасними міжнародними вимогами [4]. В методичні рекомендації включено класичні методи виділення *Cronobacter spp.*, а вони як усі традиційні лабораторні методи, є трудомісткими, тривалими, проте не завжди достатньо специфічними. Вищезазначене свідчить

про те, що класичні методи не завжди дають змогу провести чітку диференціацію представників даного виду бактерій. Найбільш достовірними на сьогодні вважаються молекулярно-генетичні методи, що засновані на виявленні ознак видоспецифічності та патогенності мікроорганізмів, які закодовані в їх генах. До таких методів належать полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

У зв'язку з тим, що вивчення бактерій *Cronobacter spp. (sakazakii)* в Україні нещодавно розпочато, в арсеналі вітчизняних лабораторних методів ще немає сучасних діагностичних тестів для їх виявлення. Враховуючи важливість вивчення таких харчових патогенів як бактерії *Cronobacter spp. (sakazakii)* в продовольчій сировині та в різних харчових продуктах, а також обов'язковість контролю за ними при виробництві сухих дитячих сумішей, постає досить актуальне питання щодо розробки та впровадження в лабораторну практику сучасних швидких, більш точних та специфічних методів ідентифікації цих мікроорганізмів на основі молекулярно-генетичних аналізів.

Метою даної роботи було визначення можливості використання для молекулярно-генетичного аналізу гену 16SrRNA, щодо виявлення та ідентифікації бактерій *Cronobacter spp. (sakazakii)* методом полімеразної ланцюгової реакції.

Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Дослідити поширення та встановити морфологічні, культуральні та біохімічні властивості ізолятів *Cronobacter spp. (sakazakii)*, виділених з сирого молока та об'єктів молочних ферм Сумської області.

2. Провести аналіз та теоретичне обґрунтування існуючих в науковій літературі послідовностей груп генів специфічних щодо бактерій *Cronobacter spp. (sakazakii)*.

3. На основі вищезазначеного провести розрахунок та розробити високоспецифічні олігонуклеотидні праймери для полімеразної ланцюгової реакції.

4. Синтезувати, випробувати розроблені праймери та провести оптимізацію умов проведення ПЛР.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження щодо виділення та ідентифікації ізолятів *Cronobacter spp. (sakazakii)* з сирого молока та об'єктів молочних ферм проводили на базі науково-навчальних лабораторій Сумського НАУ (м. Суми). Розробку та аналіз високоспецифічних

Вісник Сумського національного аграрного університету

Серія «Ветеринарна медицина», випуск 7 (37), 2015

олігонуклеотидні праймерів для полімеразної ланцюгової реакції проводили на базі відділу молекулярної біології і імунохімії Державного науково-контрольного інституту біотехнології штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ, м. Київ).

Було досліджено 25 проб сирого збірного молока корів, 30 змивів з доїльних апаратів, молочних білонів та молочних танків, поверхонь шкіри тіла та вим'я корів, підлоги тваринницьких приміщень, посівів з повітря тваринницьких приміщень. Проби для дослідження були відібрані з наступних господарств Сумської області: ТОВ АФ «Косівщинська», ТОВ АФ «Северинівське», ТОВ АФ «Лан», Дослідне господарство інституту сільського господарства північного сходу НААН, ПрАТ "Райз-Максимко" Підліснівська філія.

Проби сирого збірного молока корів для мікробіологічних досліджень відбирали та транспортували їх у лабораторію з дотриманням вимог ДСТУ ISO 5538:2004 та ДСТУ ISO 707:2002.

Мікробіологічні дослідження відібраних проб матеріалу проводили не пізніше ніж 4 години після їх відбору, а виявлення та ідентифікацію бактерій *Cronobacter spp. (sakazakii)* проводили у відповідності з методичними рекомендаціями [4]. Детальне вивчення біохімічних властивостей, виділені ізоляти проводили за допомогою Rapid 20E-тесту.

Крім того, для порівняння було використано штам *Enterobacter sakazakii* M1, який було задепоновано ще у 2011 році в колекції Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів.

Усі олігонуклеотидні праймери, які фланкують фрагменти гену 16SrDNA були розраховані за допомогою програмного забезпечення «VectorNTI» v.11.0.1 (Invitrogen) та синтезовані в «ThermoHybaid. BioSciences» (Німеччина).

Для аналізу гомології нуклеотидної послідовності ДНК *Enterobactersakazakii (Cronobacter spp.)* з генами інших бактерій використовували електронну службу BLAST 2.0 Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) США та модуль «AlignX» програмного забезпечення «VectorNTI».

Результати власних досліджень. Дослідження проводили в декілька етапів у відповідності з поставленими завданнями.

Відомо, екзогенними джерелами мікрофлори сирого збірного молока є об'єкти молочних ферм, включаючи доїльні апарати, молокопровід, ємності для зберігання молока, а також корми та підстилка. Крім того, з літератури відомо, що частота виявлення *Enterobactersakazakii (Cronobacter spp.)* в об'єктах ферм коливається від 1 до 8,7 % [1, 3, 7, 10], а вірогідність такого способу зараження сирого молока даними мікроорганізмами є досить великою, особливо, якщо доїння відбувається в тваринницьких приміщеннях, а не в доїльних залах.

На першому етапі досліджень, метою якого було в виділити та встановити морфологічні, культуральні та біохімічні властивості ізоляти бактерій *Cronobacter spp. (sakazakii)* в сирому збірному молоці корів та довікллі молочних ферм, було ідентифіковано підозрілих ізолятів 30 ізолятів по культуральним властивостям, з яких 25 були підтверджені по біохімічним властивостям (табл. 1).

Таблиця 1

Результати встановлення основних характерних культуральних та біохімічних властивостей виділених штамів бактерій *Cronobacter spp. (sakazakii)* з сирого збірного молока та об'єктів молочних ферм

Показники прояву характерних культуральних властивостей бактерій <i>Cronobacter spp. (sakazakii)</i>	Кількість досліджуваних штамів бактерій <i>Cronobacter spp. (sakazakii)</i>									
	Сире молоко (кількість проб – 5)		Секрет вим'я корів хворих на субклінічний мастит (кількість проб – 5)		Проби кормів (кількість проб–5)		Змиви з молочного танку (кількість проб – 3)		Змиви з доїльних апаратів (колектор, гума доїльних стаканів) (кількість проб–7)	
	всього/ позитивних	%	всього/ позитивних	%	всього/ позитивних	%	всього/ позитивних	%	всього/ позитивних	%
Поява росту на бульйоні збагачення для бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> по Масселю	5/4	80	5/3	60	5/4	80	3/0	-	7/4	67
На глюкозо-жовчному агарі з кристалічним фіолетовим, утворення темно-червоних колоній з ореолом навколо них, які вважаються підозрілими щодо <i>Cronobacter spp. (sakazakii)</i>	5/4	80	5/5	100	6/5	83	3/3	100	7/4	57
Утворення характерних жовтих колоній на триптон-соєвому агарі	5/2	40	5/1	20	6/6	100	3/1	33	7/4	57
В-глюкозидазна активність	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100
Індол	±	80	-	100	-	100	±	80	-	100
Реакція на оксидазу	-	100	-	100	-	100	-	100	-	100

Примітка. + - позитивна реакція; - негативна реакція; ± - слабо виражена реакція.

Як видно з наведеної таблиці, на основі вивчення культуральних та біохімічних властивос-

тей виділених ізолятів було встановлено, що за специфічністю 25 ізолятів мали високу вірогід-

ність належності до виду *Cronobacter spp. (sakazakii)*, а саме: утворювали характерні жовті колонії на триптон-соевому агарі, проявляли негативну реакцію на оксидазу та індол, мали позитивну глюкозидазну активність.

Мікроскопічними дослідженнями встановлено, що зазначені ізоляти були представлені грам-негативними, короткими з заокругленими кінцями паличками, які не мали спор та капсул. В мазках розміщувалися поодинокі чи в густих скупченнях.

Дані ізоляти були передані до відділу молекулярної біології і імунохімії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів до подальшого дослідження молекулярними методами.

Наступний етап досліджень передбачав проведення аналізу та теоретичне обґрунтування існуючих в науковій літературі послідовностей груп генів специфічних щодо бактерій

Cronobacter spp. (sakazakii). Оскільки *Cronobacter spp. (sakazakii)* має широкі філогенетичні зв'язки з іншими представниками роду *Enterobacter spp. (E. cloacae, E. herbicola, E. agglomerans)*. та родом *Pantoea (P. agglomerans)*, це дещо ускладнює їх диференціацію молекулярно-генетичними методами. За даними наукової літератури, в багатьох країнах, проводяться дослідження по підбору для молекулярної діагностики *Cronobacter spp. (sakazakii)* генів-мішеней (16SrRNA, *gluA, ompA, gyrB*; MMS оперон (*dnaG, rpsU, rpoD*), які б забезпечили необхідну вірогідність в виявленні та ідентифікації збудника.

В результаті проведеного пошуку та аналізу послідовностей генів з консервативними та варіабельними ділянками у бактерій *Cronobacter spp. (sakazakii)*, були розроблені кілька пар олігонуклеотидних праймерів специфічних різним ділянкам гена 16SrRNA (табл. 2, рис.1).

Таблиця 2

Пари олігонуклеотидних праймерів, специфічних різним ділянкам гена 16SrRNA та послідовності генів з консервативними та варіабельними ділянками у бактерій *Cronobacter spp. (sakazakii)*

№	Праймер	Послідовність(5'→3')	Розмір фрагмента(п.н.)
1	d16sakF1	ТААСТССГТГССАГСАГСС	451
2	d16SsakR	ТАААССАСАТГСТССАССГСТ	
3	d16SsakF3	ГССАГГСТТГАТСТСГТАГ	314
4	2d16S-F	АГСТААТАССГСАТААСТГСТАСТ	863
5	2d16S-R	АГГСАСТСССГАТСТСГТ	

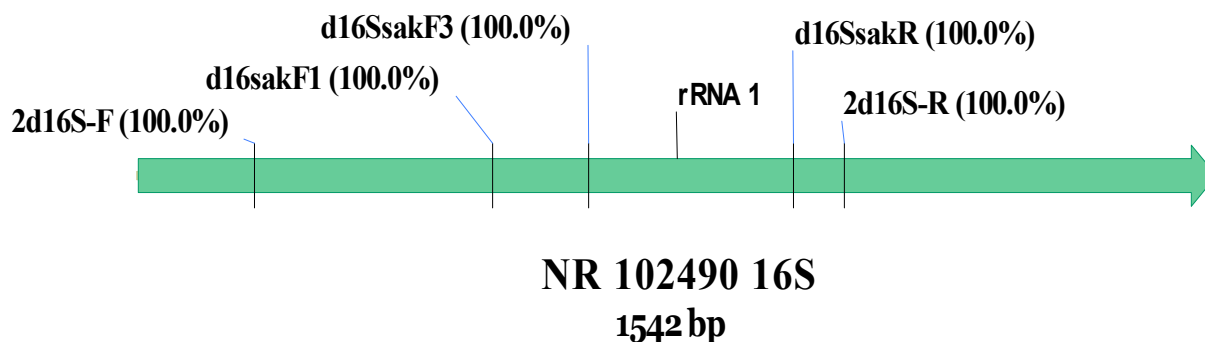


Рис.1. Характеристика гомології олігонуклеотидних праймерів на гені 16SrRNA *Cronobactersakazakii*(ATCCBAA-894)

Заключним етапом роботи було випробувати розроблені нами праймери та провести оптимізацію умов проведення ПЛР.

При використанні цих праймерів в ПЛР з ДНК виділених ізолятів бактерій *Cronobacter spp. (sakazakii)* були отримані попередні позитивні результати з 20 ізолятами, серед них один був контамінований, бактерією *Yersiniaenterocolityca*.

Результати проведеної роботи наведено на рисунках 2 та 3.

Враховуючи значну гомологію між послідовностями гена 16SrRNA *Cronobacter spp.* та *Enterobactercloace*отримані в ПЛР результати розглядаємо як проміжні (попередні) і усі виділені ізоляти будуть додатково охарактеризовані за геном *ompA*.

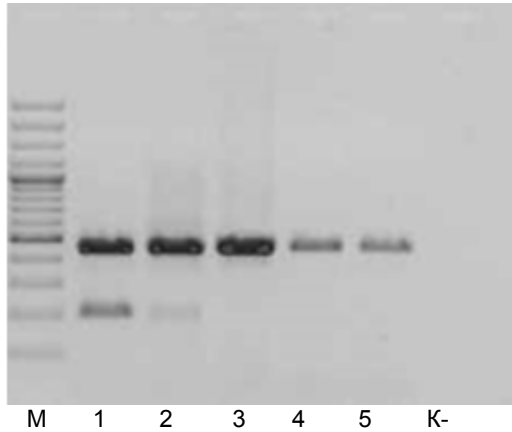


Рис. 2. Результати електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР з праймерами d16sakF/d16SsakR: М - маркер "100 bpPlusDNALadder" (Fermentas); 1,2 – депонований штаб *Cronobactersakazakii* (ДНКБШМ); 3 – ізолят 1 (колектор); 4 – ізолят 2 (вим'я); 5 – ізолят 3 (корм); К(-) – негативний контроль.

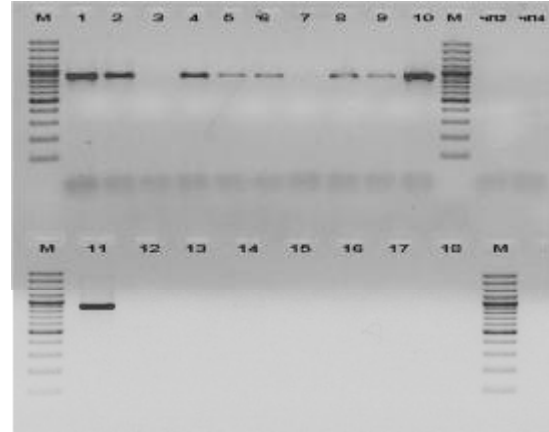


Рис. 3. Результати електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР з праймерами 2d16S-F/d16SsakR: М - маркер "100 bpPlusDNALadder" (Fermentas); 1-18 – виділені ізоляти; чп2 та чп4 – гетерологічні негативні котролі (*B.subtilis*, *E.coli*).

Висновки. 1. Із досліджуваних проб сирого молока, секрету вим'я корів хворих на субклінічний мастит, змивів з молочного обладнання та проб кормів, в яких ідентифіковано 25 підозрілих ізолятів щодо бактерій *Cronobacter spp.* (*sakazakii*) по культуральним та біохімічним властивостям, 20 ізолятів були перевірені в ПЛР з праймерами на ген 16SrRNA.

2. Бактерії *Cronobacter spp.* (*sakazakii*) мають філогенетичні зв'язки з іншими бактеріями родини *Enterobacteriaceae* (*Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.* та *Escherichia spp.*) і особливо є близько спорідненими з бактеріями *Enterobactercloacae* та *Enterobacteragglomerans*, що ускладнює їх диференціацію і вимагає прове-

дення молекулярно-генетичного аналізу за кількома генами.

3. Були розроблені кілька пар олігонуклеотидних праймерів, специфічних різним ділянкам гена 16SrRNA, при використанні яких в ПЛР з ДНК виділених ізолятів були отримані попередні позитивні результати з 20 ізолятами бактерій *Cronobacter spp.* (*sakazakii*).

4. Достовірна ідентифікація *Cronobacter spp.* (*sakazakii*) на даний час можлива лише за умови використання комплексного підходу, що базується на комбінуванні класичних методів дослідження (мікроскопія, культуральні і біохімічні характеристики) так і молекулярно-генетичних (ПЛР, секвенування гена 16SrRNA).

Список використаної літератури:

1. Бергілевич О.М. Теоретичне та експериментальне обґрунтування оцінки мікробіологічного ризику *Enterobacter sakazakii* в молоці корів. – Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук. – НУБіП України, Київ, 2011. – 360 с.
2. Ефимочкина Н.Р. Идентификация нового вида патогенных микроорганизмов *Enterobacter sakazakii* с использованием современных таксономических подходов / Н.Р. Ефимочкина // Вопросы питания. – 2009. – Том 78, № 3. – С. 25-32.
3. Идентификация *Enterobactersakazakii* в сыром молоке для производства сухих детских смесей / Бергілевич А.Н., Гришина Е.А., Касянчук В.В. // Восточно-Европейский журнал передовых технологий (ISSN:1729-4061 (IndexCopernicus(Польша), РИНЦ (Россия))). – 2/12 (68). – 2014. – С. 42-47.
4. Методи виділення та підрахунку кількості бактерій *Enterobacter (Cronobacter) sakazakii* / О.М. Бергілевич, В.В. Касянчук, Т.О. Гаркавенко, Н.А. Межинська // Затверджені науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України (пр. № 1 від 23 грудня 2010 р). – 2010 – 38 с.
5. Методичні рекомендації щодо встановлення відповідності мікробіологічним критеріям харчових продуктів та санітарно-гігієнічних умов виробничого процесу / В.В. Касянчук, О.М. Бергілевич, Д.А. Засєкін, М.Д.Кухтін, Т.О. Гаркавенко, О.О. Бергілевич, О.О. Каганець, А.М. Марченко // Затверджені вченою радою ДНДІ ЛДВСЕ (протокол № 3 від 20 квітня 2011р). – 28 с.
6. Мікробіологічні критерії для харчових продуктів / В.В. Касянчук, О.М. Бергілевич, М.П. Остапюк [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 6. – С. 36-40.
7. Bergilevich O. Thelevel of contamination raw cow's milk by microorganisms of thefamily *Enterobacteriaceae* including bacteria *Enterobacter sakazakii* at farms of Ukraine / Bergilevich O., Kasianchuk V., Marchenko A. // Food Hygiene and Technology - 43st Lenfeld'sand Hökl'sDays. – Veterinární a farmaceutic káuniverzitaBrno, 2-3 Oct., 2013. – P. 100-103.

8. Dumen E. *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*): Only An Infant Problem? / E. Dumen // Kafkas Univ. Vet. Fak. – 2010. – № 16. – P. 171-178.

9. Iversen C. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and description of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonicus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. / C. Iversen, A. Lehner, N. Mullane // BMC Evol Biol. – 2007. – № 7. – P. 64.

10. Farber J.M. *Enterobacter sakazakii* / J.M. Farber, S.J. Forsythe // American Society for Microbiol. Press, Washington, D.C., USA, 2008. – 284 p.

11. Microbiological criteria for foodstuff: Commission Regulation (EC) № 2073/2005 of 15 November 2005 / Official Journal of the European Union. – 2005. – 26 p.

Бергилевич А.Н., Ушкалов В.А., Касянчук В.В., Дерябин О.Н., Гришина Е.А. Обнаружение и идентификация бактерий *Cronobacter* spp. (*sakazakii*) методом полимеразной цепной реакции

В статье представлены результаты исследований, которые впервые проведенные в Украине относительно возможности идентификации бактерий *Cronobacter* spp. (*sakazakii*) методом полимеразной цепной реакции с использованием гена 16SrRNA. Изоляты бактерий *Cronobacter* spp. (*sakazakii*) были выделены из сырого молока и объектов молочных ферм Сумской области. Среди выделенных изолятов, было выбрано 25 имеющих характерные морфологические, культуральные и биохимические свойства для проведения ПЦР. После поиска и анализа последовательностей генов с консервативными и переменными участками у бактерий *Cronobacter* spp. (*sakazakii*), были разработаны несколько пар олигонуклеотидных праймеров, специфических различным участкам гена 16SrRNA. При использовании этих праймеров в ПЦР с ДНК выделенных изолятов были получены предварительные положительные результаты с 20 изолятами бактерий *Cronobacter* spp. (*sakazakii*).

Согласно полученным данным, достоверная идентификация *Cronobacter* spp. (*sakazakii*) в настоящее время возможна только при использовании комплексного подхода, основанного на комбинировании классических методов исследования (микроскопия, культуральные и биохимические характеристики) с молекулярно-генетическими.

Ключевые слова: *Cronobacter* spp. (*sakazakii*), полимеразная цепная реакция (ПЦР), 16SrRNA, олигонуклеотидные праймеры.

Berhilevych O., Ushkalov V., Kasyanchuk V., Deryabin O., Grishina E. Detection and identification of bacteria *Cronobacter* spp. (*sakazakii*) by polymerase chain reaction

The article presents the results of research, that were conducted for the first time in Ukraine, concerning possibility of identification bacteria *Cronobacter* spp. (*sakazakii*) by polymerase chain reaction using 16SrRNA gene. Isolates of bacteria *Cronobacter* spp. (*sakazakii*) were isolated from raw milk and dairy farms objects in Sumy region. Among the isolates, 25 were selected, which had typical morphological, cultural and biochemical properties for PCR. After searching and sequence analysis of genes with conserved and variable regions in bacteria *Cronobacter* spp. (*sakazakii*), there have been several pairs of oligonucleotide primers specific to various portions of the gene 16SrRNA. By using these primers in PCR DNA isolates were obtained preliminary positive results with 20 bacterial isolates *Cronobacter* spp. (*sakazakii*).

According to information received, reliable identification of *Cronobacter* spp. (*sakazakii*) is currently only possible using a comprehensive approach based on a combination of classical methods (microscopy, culture and biochemical characteristics) with molecular genetic methods.

Keywords: *Cronobacter* spp. (*sakazakii*), polymerase chain reaction (PCR), 16SrRNA, oligonucleotide primers.

Дата надходження до редакції: 03.03.2015 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Кассіч В.Ю.

УДК 619.5:6616-085.636.5

**ЧУТЛИВІСТЬ ЦИРКУЛЮЮЧИХ ШТАМІВ САМПУЛОВАКТЕР SPP.
ДО ДІЇ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ**

С.М. Гладченко, аспірант, Сумський національний аграрний університет

У статті викладені результати досліджень чутливості циркулюючих штамів *Sampylobacter* spp., виділених з продуктів забою птиці, обладнання забійних цехів та із продуктів забою ВРХ, до 12 видів антибіотиків різних груп. Досліджувані штами кампілобактерій високочутливі до еритромі-