

УДК 619:614.31:579.852:637.5'62

ЛАПА О.Ю., аспірантка

ЯКУБЧАК О.М., д-р вет. наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

ЗАГРЕБЕЛЬНИЙ В.О., канд. вет. наук

ДНДІ з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

llu706@mail.ru

ВИЯВЛЕННЯ ДЖЕРЕЛ КОНТАМІНАЦІЇ *CAMPYLOBACTER* ЯЛОВИЧИНИ

У статті наведено дані про бактерії роду *Campylobacter*, як збудників інфекцій, що перебігають з ознаками токсикоінфекцій у людей. Проведено дослідження об'єктів довкілля ферми (води з напувалки, різних видів корму та підстилки) щодо виявлення кампілобактерій методом полімеразної ланцюгової реакції. За даними проведених наукових досліджень встановлено, що об'єкти довкілля ферми обсеменені бактеріями роду *Campylobacter*, які в подальшому можуть потрапляти до організму тварин.

Ключові слова: кампілобактерії, велика рогата худоба, молочно-товарна ферма, корм, вода, полімеразна ланцюгова реакція.

Постановка проблеми. З кожним роком в Україні та світі реєструється збільшення ризиків виникнення харчових токсикоінфекцій у людей під час вживання контамінованих продуктів харчування та води. Останнім часом істотне значення в етіології гострих кишкових інфекцій набувають “нетрадиційні” бактерії. Серед цих мікроорганізмів найбільше значення становить рід *Campylobacter*, на частку яких припадає до 10–15 % випадків спорадичних діарейних захворювань, а також значна кількість водних, харчових, зокрема молочних спалахів, описаних в іноземній літературі. Питанням кампілобактеріозної інфекції значну увагу приділяє Всесвітня організація охорони здоров'я. За її ініціативою вивчення даної інфекції включено до національних програм профілактики діарейних хвороб.

Основним природним резервуаром кампілобактерій є кури, індики, дикі птахи, гризуни, а також велика рогата худоба, вівці, кози, свині. У великої рогатої худоби кампілобактерії локалізуються, в основному, у кишечнику і виділяються з фекаліями, інфікуючи навколишнє середовище, а під час забою та первинної переробки – продукти забою [1]. Згідно з даними G. Douglas Inglis [2], близько 25 % тварин можуть бути прихованими бактеріоносіями. *Campylobacter fetus subsp. fetus* у великої рогатої худоби вважається облігатною мікрофлорою травного каналу, але може бути й причиною спорадичних абортів [3]. Бактеріоносійство *Campylobacter jejuni* і *Campylobacter coli*, в середньому, складає 14,7 і 6,9 %, відповідно [4]. У деяких країнах рівень інфікування великої рогатої худоби даним збудником сягає 29 % [5].

Передається дана інфекція через забруднені кампілобактеріями годівниці, напувалки, інвентар, підстилку, інфіковані корми, особливо тваринного походження, воду. Важливою ланкою в епізоотичному ланцюзі є інфіковані мухи, таргани, гризуни, синантропна та дика птиця тощо.

Кампілобактерії (*Campylobacter species*) – грамнегативні бактерії у вигляді спіралі чи римської V, котрі є причиною інфекції, що перебігає з ознаками токсикоінфекції у людей. За даними на 2013 р. рід *Campylobacter* об'єднує 17 видів і 6 підвидів бактерій. При цьому для сільськогосподарських тварин і людей найбільше етіологічне значення мають види *C. jejuni* та *C. coli* [6]. У 80 % випадків причиною кампілобактеріозної інфекції вважається *Campylobacter jejuni*, а в 18,6 % – *Campylobacter coli*.

Виявлення ДНК *Campylobacter species* у дослідному матеріалі за відсутності клінічних проявів інфікування свідчить про бактеріоносійство, що у разі порушень під час первинної переробки тварин та обігу продуктів забою може сприяти підвищенню кількості вказаних мікроорганізмів (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* [7]) і ризику виникнення інфекцій, що перебігають з ознаками токсикоінфекцій у споживачів.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Складність культивування кампілобактерій та висока вартість бактеріологічних досліджень призводить до недооцінювання значення кампілобактерій в етіології гострих кишкових інфекцій, що перебігають з ознаками токсикоінфекцій у

людей, що сприяє спотворенню реальної картини поширення даної інфекції. В Україні реєстрація інфікування кампілобактеріями залишається на низькому рівні, і захворюваність складає менше одного випадку на 100 тисяч населення в рік [8], тоді як цільовий моніторинг кампілобактерій у структурі гострих кишкових інфекцій, що перебігають з ознаками токсикоінфекцій у людей у Західних країнах дозволяє виявляти від 50 до 100 випадків кампілобактеріозного інфікування на 100 тисяч населення [9].

Сучасні методи діагностики, такі як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), можуть прискорити та зменшити витрати на постановку діагнозу за інфікування кампілобактеріями людей і тварин, а також під час контролю безпечності продуктів харчування. Метод ПЛР є експрес-методом, який дозволяє виконувати аналіз впродовж 4–8 годин, має високу чутливість, специфічність, забезпечує можливість роботи з будь-яким видом біологічного матеріалу, пробами з об'єктів довкілля, включаючи харчові продукти [10, 11].

Мета дослідження – провести дослідження щодо виявлення бактерій роду *Campylobacter* у об'єктах довкілля (вода, корм та підстилка) молочно-товарної ферми методом полімеразної ланцюгової реакції.

Матеріал і методика дослідження. Матеріалами досліджень слугували: вода з напувалки, суміш силосу та сінажу з годівниці та зі складу, підстилка на фермі.

Дослідження проводили в акредитованій лабораторії відділу молекулярної біології та імунохімії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Пробопідготовку для виділення ДНК *Campylobacter* з дослідних проб проводили згідно з «Методичними рекомендаціями з відбору, транспортування, зберігання та пробопідготовки біологічного матеріалу для ПЛР-діагностики» [12]. Виділення ДНК із дослідного матеріалу проводили за допомогою Амплі Сенс ПЛР-тест-системи «ДНК-сорб-В-50». Детекцію продуктів ПЛР-ампліфікації визначали електрофоретичним розділенням ампліфікаційної суміші в зафарбованому бромистим етидієм агаровому гелі.

Результати досліджень та їх обговорення. Нині кампілобактеріозне інфікування серед людей і тварин зареєстровано у багатьох країнах світу на всіх континентах. У деяких регіонах розвинених країн цю інфекцію реєструють частіше, ніж сальмонельоз і шигельоз. Щодо України, то інфекції, що перебігають з ознаками токсикоінфекцій, збудниками яких є кампілобактерії, мало вивчені і майже не досліджуються або належать до інфекцій невизначеної етіології.

Рівень поширення бактерій роду *Campylobacter* у об'єктах довкілля, що трапляються в Україні, зазвичай визначається на підставі результатів скринінгових досліджень, що використовуються лише для виявлення наявної інфекції. Натомість за кордоном у разі отримання позитивного результату під час дослідження скринінговим методом обов'язково проводиться підтвердження отриманих результатів арбітражним методом для ідентифікації збудників.

Нами проведені дослідження скринінговим методом (ПЛР) об'єктів довкілля в умовах тваринницької ферми.

Проби корму та підстилки відбирали у стерильні поліетиленові пакети, проби води – у стерильні одноразові контейнери, які щільно закривали та підписували. Доставку біоматеріалу здійснювали в сумці-холодильнику відразу після відбору проб і досліджували відразу після надходження проб до лабораторії (не пізніше 2-х год з моменту відбору проб).

Для приготування бактеріальної фракції з корму та підстилки до досліджуваного матеріалу додавали 0,9 % розчин натрію хлориду у співвідношенні 1:10, ретельно перемішували, відстоювали 10 хв для осідання великих часточок. Відбирали супернатант та центрифугували. Воду для досліджень теж центрифугували згідно з методичними рекомендаціями.

Ампліфікацію проводили Амплі Сенс ПЛР-тест-системою «ДНК-сорб-В-50». Після виділення чистої ДНК дослідні проби були піддані електрофорезу, щоб виявити наявність кампілобактерій. При цьому бромистий етидій зв'язався з фрагментами дволанцюгової ДНК, які проявилися в гелі у вигляді світлих смуг за УФ-випромінення ($\lambda=290-330$ нм). Для візуалізації таких смуг використовували спеціальний прилад – транслюмінатор, а отримані результати документували фотографуванням (рис. 1). Як позитивний контроль використовували шкалу ДНК, яка містила фрагменти ДНК кампілобактерій різної довжини (стовпчик праворуч) для оцінки розміру продуктів реакції ПЛР.

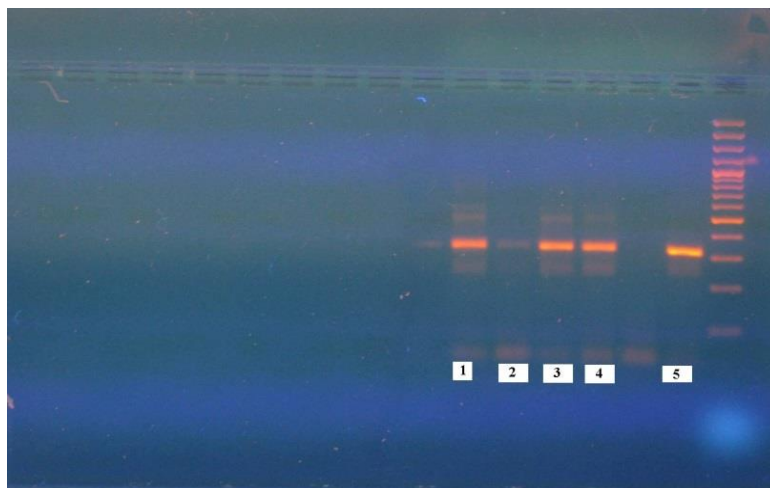


Рис. 1. Результати електрофорезу продуктів полімеразної ланцюгової реакції:

1) вода з напувалки; 2) суміш силосу та сінажу зі складу; 3) суміш силосу та сінажу з годівниці; 4) підстилка; 5) контроль.

Наші дослідження показали (рис. 1), що вода, суміш силосу та сінажу з годівниці та підстилка позитивно прореагували щодо наявності в них бактерій роду *Campylobacter*. Фрагменти ДНК розділилися за молекулярною масою в агаровому гелі. Специфічність смуг ампліфікованої ДНК підтвердилася їхнім розміщенням відносно маркерів молекулярної маси і розміщення фрагмента позитивного контролю ампліфікації.

Але, слід зазначити, що для проведення повномасштабних досліджень кампілобактерій однієї експрес-діагностики недостатньо. Потрібно проводити мікробіологічні підтвердження. Нині у світі існують нормативні документи щодо виявлення *Campylobacter*, але в Україні цей збудник практично не вивчений і майже не досліджується.

Нами в декілька етапів проведені мікробіологічні дослідження з виділення *Campylobacter* з об'єктів довкілля тваринницької ферми. Проби для бактеріологічних досліджень доставляли в акредитовану лабораторію впродовж 2-х год з моменту їх відбору в стерильних одноразових поліетиленових пакетах. Дослідні порції спочатку вносили у рідке поживне середовище збагачення (бульйон Болтона) у співвідношенні дослідна проба/середовище збагачення 1:10 та гомогенізували. Культивували в мікроаеробній атмосфері за температури 37 °C протягом 4–6 год, а потім ще за температури 41,5 °C упродовж 48 год. Культури мікроорганізмів, що виростили в середовищі накопичування, висівали стерильною петлею на поверхню селективного середовища: деревно-вугільний дезоксихолатний агар із цефоперазоном (mCCD-агар) та на агар Престона. Посіви інкубували за температури 41,5 °C у мікроаеробній атмосфері. Через 48 год інкубування чашки перевіряли на наявність типових колоній *Campylobacter*. Відзначали плоскі, вологі колонії сіруватого забарвлення. Для підтвердження з кожної чашки кожного селективного середовища відбирали типові колонії та наносили штрихом на чашки з колумбійським кров'яним агаром, щоб одержати чітко відокремлені колонії. Інкубували чашки в мікроаеробній атмосфері за температури 41,5 °C впродовж 48 год. Під час перевірки результатів колоній не виявили взагалі. Причин відсутності росту колоній може бути безліч: недотримання технології відбору проб, відсутність середовища транспортування, не якісні поживні середовища, відсутність вітчизняних середовищ, мікроорганізмів *Campylobacter* взагалі, кваліфікованих фахівців та досвіду щодо виявлення вказаних мікроорганізмів.

Отже, об'єкти довкілля ферми обсеменені бактеріями роду *Campylobacter*, проте підтвердити це мікробіологічними методами поки що нам не вдалося.

Висновки. Дослідженнями встановлено, що бактерії роду *Campylobacter* наявні в об'єктах довкілля ферми, таких як вода, суміш силосу та сінажу з годівниці і підстилка, які в подальшому можуть потрапляти до організму тварин.

Результати даної роботи спонукають нас проводити подальші дослідження щодо кількості та виду бактерій *Campylobacter* в об'єктах довкілля (вода, корм, підстилка) та щодо виявлення кампілобактерій у сирій яловичині після забою великої рогатої худоби.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Isolation, characterization, and serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from slaughter cattle / M.M. Garcia, H. Lior, R.B. Stewart [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1985. – Vol. 49. – P. 667–672.
2. Inglis G.D. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces / G.D. Inglis, L.D. Kalischuk // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2003. – Vol. 69. – P. 3435–3447.
3. Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Campylobacter fetus* in cattle / H. Zhao, H. Liu, Y. Du [et al.] // *Res. Vet. Sci.* – 2010. – Vol. 88. – P. 446–451.
4. Spatio temporal homogeneity of *Campylobacter* subtypes from cattle and sheep across north eastern and south western Scotland / O. Rotariu, J.F. Dallas, Ogden I.D. [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75. – P. 6275–6281.
5. Schmidt T. Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates / T. Schmidt, E.H. Venter, J.A. Picard // *Journal of the South African Veterinary Association*. – 2010. – Vol. 81. – P. 87–92.
6. Вивчення біологічних властивостей польових ізолятів і музейних штамів кампілобактерій / А.Ф. Бабкін, О.В. Обуховська, В.А. Куценко, Т.В. Калініченко // *Вет. медицина: міжвід. темат. наук. зб.* – Харків, 2013. – Вип. 97. – С. 57–60.
7. Режим доступу: <http://www.analizmarket.ru/tests/id/4302/>.
8. Современные клинико-терапевтические аспекты кампилобактериоза у детей / Е.А. Силина, Е.В. Усачева, Т.М. Пахольчук [и др.] // *Современная педиатрия*. – 2011. – № 2. – С. 68–70.
9. Detection of antibodies to *Campylobacter* in humans using enzyme-linked immunosorbent assays: a review of the literature / K.G. Kuhn, G. Falkenhorst, T. Ceper [et al.] // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 74. – P. 113–118.
10. Головка А.М. Ветеринарна санітарна мікробіологія: навч. посіб. / А.М. Головка, І.О. Рубленко. – К.: Аграрна наука, 2010. – 284 с.
11. Возможность применения ПЦР в ветеринарии [Электронный ресурс] // *Птицеводство*. – 2009. – Режим доступу: <http://webpticeprom.ru/ru/articles-veterinary.html?pageID=1260097527>.
12. Методические рекомендации по взятию, транспортировке, хранению и пробоподготовке биологического материала для ПЦР-диагностики / ЦНИИЭ МЗ РФ. – М., 2003. – 7 с.

REFERENCES

1. Isolation, characterization, and serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from slaughter cattle / M.M. Garcia, H. Lior, R.B. Stewart [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1985. – Vol. 49. – P. 667–672.
2. Inglis G.D. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces / G.D. Inglis, L.D. Kalischuk // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2003. – Vol. 69. – P. 3435–3447.
3. Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Campylobacter fetus* in cattle / H. Zhao, H. Liu, Y. Du [et al.] // *Res. Vet. Sci.* – 2010. – Vol. 88. – P. 446–451.
4. Spatio temporal homogeneity of *Campylobacter* subtypes from cattle and sheep across north eastern and south western Scotland / O. Rotariu, J.F. Dallas, Ogden I.D. [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75. – P. 6275–6281.
5. Schmidt T. Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates / T. Schmidt, E.H. Venter, J.A. Picard // *Journal of the South African Veterinary Association*. – 2010. – Vol. 81. – P. 87–92.
6. Vychennja biologichnyh vlastyvostryj pol'ovyh izoljativ i muzejnyh shtamiv kampilobakterij / A.F. Babkin, O.V. Obuhov's'ka, V.A. Kucenko, T.V. Kalinichenko // *Vet. medycyna: mizhvid. temat. nauk. zb.* – Harkiv, 2013. – Vyp. 97. – S. 57–60.
7. Rezhym dostupu: <http://www.analizmarket.ru/tests/id/4302/>.
8. Sovremennye kliniko-terapevticheskie aspekty kampilobakterioza u detej / E.A. Silina, E.V. Usacheva, T.M. Pahol'chuk [i dr.] // *Sovremennaja pediatrija*. – 2011. – № 2. – S. 68–70.
9. Detection of antibodies to *Campylobacter* in humans using enzyme-linked immunosorbent assays: a review of the literature / K.G. Kuhn, G. Falkenhorst, T. Ceper [et al.] // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 74. – P. 113–118.
10. Golovko A.M. Veterynarna sanitarna mikrobiologija: navch. posib. / A.M. Golovko, I.O. Rublenko. – K.: Agrarna nauka, 2010. – 284 s.
11. Vozmozhnost' primenenija PCR v veterinarii [Jelektronnyj resurs] // *Pticevodstvo*. – 2009. – Rezhim dostupu: <http://webpticeprom.ru/ru/articles-veterinary.html?pageID=1260097527>.
12. Metodicheskie rekomendacii po vzjatiju, transportirovke, hraneniju i probopodgotovke biologicheskogo materiala dlja PCR-djagnostiki / CNIIE MZ RF. – M., 2003. – 7 s.

Выявление источников контаминации *Campylobacter* говядины

Е.Ю. Лапа, О.Н. Якубчак, В.А. Загребельный

В статье приведены данные о бактериях рода *Campylobacter*, как возбудителей инфекций, протекающих с признаками токсикоинфекций у людей. Проведено исследование объектов окружающей среды фермы (воды с поилки, различных видов корма и подстилки) на предмет выявления кампилобактерий методом полимеразной цепной реакции.

По данным проведенных научных исследований установлено, что объекты окружающей среды фермы обсеменены бактериями рода *Campylobacter*, которые в дальнейшем могут попадать в организм животных.

Ключевые слова: кампилобактерии, крупный рогатый скот, молочно-товарная ферма, корм, вода, полимеразная цепная реакция.

Надійшла 07.04.2015 р.