

УДК 636.09:579.84:303.64

Пустовит Н.А., и.о. заведующего сектором
Пинчук Н.Г., кандидат ветеринарных наук

Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов, г. Киев

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТА *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ ПТИЦЫ

Резюме

Многие исследования показали, что *C. jejuni* вызывает столько же случаев гастроэнтерита человека, что и *Salmonella* sp. Продукты питания являются важным средством заражения людей. В качестве потенциальных источников инфекции также служат другие продукты животного происхождения. *C. jejuni* была обнаружена на тушах домашней птицы и других домашних животных во всем мире. Методы, разработанные для использования в клинических лабораториях, не обладают необходимой чувствительностью и селективностью и поэтому имеют ограниченное применение при выявлении небольших количеств *C. jejuni* в пищевых продуктах. В данной статье приведены исследования культурально-морфологических и биохимических свойств *C. Jejuni*, выделенного от птицы.

Summary

Many studies have revealed that *C. jejuni* causes at least as many cases of human gastroenteritis as does *Salmonella* sp. Foods are an important vehicle in human infection. Other animal products also serve as potential sources of infection. *C. jejuni* has been found on the carcasses of poultry and other domestic animals throughout the world. Methods developed for use in clinical laboratories lack the necessary sensitivity and selectivity, and therefore have limited use in detecting small numbers of *C. jejuni* in foods. In this article, studies of the culture-morphological and biochemical properties of *C. Jejuni* isolated from poultry are presented.

Поступила в редакцию 06.08.2018 г.

ВВЕДЕНИЕ

Кампилобактериоз (*Campylobacteriosis*) – инфекционное антропозоонозное заболевание, характеризующееся острым течением, общей интоксикацией и поражением преимущественно желудочно-кишечного тракта и возможной генерализацией патологического процесса. Так, у людей кампилобактерии попадают в организм чаще с контаминированными продуктами питания животного происхождения. Среди всех кампилобактеров наиболее значимые в развитии заболевания у людей *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter coli* [1].

Кампилобактериоз инфекционная болезнь, которая проявляется в форме энтерита, гепатита, септицемии и интоксикации. Кампилобактерии очень чувствительны к действию физико-химических факторов (прямые солнечные лучи, высушивание,

нагревание и т.д.) [2].

Основным природным резервуаром кампилобактеров являются куры, индюки, дикие птицы, грызуны, а также овцы, козы, свиньи, крупный рогатый скот. Бройлеры могут быть инфицированы кампилобактериями до 90 %, индюки – до 100 %, утки – до 88 %, при этом клинические признаки болезни у них отсутствуют. Кампилобактерии у птицы локализуются в основном в кишечнике и выделяются с помётом, инфицируя окружающую среду [2].

Кампилобактеры, являясь микроаэрофилами, не обладают способностью длительно выживать во внешней среде при контакте с кислородом, однако они хорошо сохраняются в водной среде при низких температурах [3].

Основной путь передачи инфекции в организме человека – потребление контаминированного возбудителем недоварен-

ного мяса (особенно птицы), непастеризованного молока или молочных продуктов, а также загрязненной воды. Заражение возможно также через контакт с инфицированными животными или их фекалиями [4].

Поэтому сегодня важной задачей, стоящей перед специалистами ветеринарной медицины относительно кампилобактериоза, является обеспечение эпизоотического благополучия среди поголовья домашних животных, особенно птиц, проведение качественной диагностики и постоянный контроль продуктов питания животного происхождения на наличие кампилобактеров [5].

Для лабораторной диагностики кампилобактериоза основного бактериологического метода с выделением чистой культуры возбудителя может быть недостаточно, поэтому для подтверждения результата используют и другие методы [6].

Проведение исследования материалов на наличие кампилобактерий микробиологическим методом требует значительных затрат времени, ресурсов, приборов и наличия определенных навыков рабочего персонала. Кроме этого, при применении данного метода следует помнить о возможности кампилобактеров существовать в жизнеспособной, но не культивируемой форме, в форме, которую сложно выделить в чистом виде.

Первоочередной задачей бактериологического исследования является выделение чистой культуры. С этой целью используют несколько методов:

- высеив исследуемого материала непосредственно на селективные питательные среды;
- накопление в жидкой питательной среде;
- изолирование отдельных колоний и выделение чистой культуры для подтверждения видовой специфичности;
- подтверждение результата.

Эти актуальные положения и определили выбор направления наших исследований и методы исполнения работы.

Цель наших исследований – изучение свойств изолята *Campylobacter Jejuni*, выделенного от птицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Культурально-морфологические свойства *Campylobacter jejuni* определяли путем культивирования микроорганизма в жидких питательных средах (триптон-соевый бульон (ТСБ Himedia), полужидкий триптон-соевый агар (НТСА), триптон-соевый агар (ТСА Himedia), кампилобакагар (Himedia M-994)) и окраской мазков, изготовленных из суточных культур, по Грамму.

Биохимические свойства штамма определяли путем культивирования в питательной среде «Основа бульона с фенольных красным М-054» производства «Himedia» с арабинозой, глюкозой, дульцитом, мальтозой, лактозой, маннитом, маннозой, рамнозой, салицином, сорбитолом, сахарозой, ксилозой, галактозой, фруктозой, адонитом, инулином, инозитом, целобиозой, мелибиозой, трегалозой.

Антибиотикочувствительность изучали диско-диффузальным методом с использованием стандартных дисков производства «Himedia» с противомикробными препаратами.

Исследования проводили согласно действующему нормативному документу ДСТУ ISO 10272:2007.

Дифференциальную диагностику проводили с помощью определителя Берджи и подтверждали ПЦР.

ПЦР проводили на четырехканальном амплификаторе «Терцик» производства НПФ «ДНК-Технология» (Россия, г. Москва). В состав тест-системы для проведения 55 анализов, включая контрольные образцы, входит набор реактивов для выделения ДНК и набор реактивов для проведения ПЦР на выявление ДНК бактерий рода *Campylobacter spp.*; набор реактивов для проведения электрофоретического анализа продуктов ПЦР.

Для выделения ДНК был выбран метод лизиса клеток гуанидинтиоционатом с последующей сорбцией дезоксирибонуклеиновой кислоты на сорбенте.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Через 48–72 часа культивирования *Campylobacter jejuni* при температуре плюс $41,5 \pm 0,5$ °С на ТСА и кампилобакагаре образовывались мелкие, гладкие, выпуклые, блестящие, с ровными краями колонии, в ТСБ – равномерное помутнение с формированием серо-белого диска на поверхности среды. На НСТА рост заметен по ходу укола столбика с формированием серо-белого диска на поверхности среды.

В микроскопических препаратах окрашенные по Грамму, грамтрицательные тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки, расположенные одиночно и парно, в поле зрения попадала и кокковая форма.

Результаты биохимических свойств изолята *Campylobacter jejuni* представлены в таблице 1. Пробирки ежедневно просматривали в пронизывающем свете на протяжении 14 суток.

Таблица 1. – Биохимические свойства выделенного изолята *Campylobacter jejuni*

| Название сахара | Результат |
|-----------------|------------------------------------|
| арабиноза | к ⁻ г ⁻ |
| глюкоза | к⁺ г⁻ |
| дульцит | к ⁻ г ⁻ |
| мальтоза | к ⁻ г ⁻ |
| манит | к ⁻ г ⁻ |
| манноза | к ⁻ г ⁻ |
| рамноза | к ⁻ г ⁻ |
| салицын | к ⁻ г ⁻ |
| сорбитол | к ⁻ г ⁻ |
| сахароза | к⁺ г⁻ |
| ксилоза | к ⁻ г ⁻ |
| галактоза | к ⁻ г ⁻ |
| фруктоза | к ⁻ г ⁻ |
| адонит | к ⁻ г ⁻ |
| инулин | к ⁻ г ⁻ |
| иннозит | к ⁻ г ⁻ |
| целобиоза | к ⁻ г ⁻ |
| мелибиоза | к ⁻ г ⁻ |
| трегалоза | к ⁻ г ⁻ |
| лактоза | к⁺ г⁻ |

Примечание – к⁻ г⁻ – не ферментирует сахар к⁺ г⁻ – ферментирует с образованием кислоты без газа

Согласно исследованиям, выделенный изолят ферментирует глюкозу, лактозу, сахарозу, гидролизует пируват, каталазный тест положительный.

Чувствительность изолята к противомикробным веществам определяют диско-диффузальным методом с использованием стандартных дисков с противомикробными веществами. Степень противомикробной

чувствительности микроорганизмов устанавливают по диаметру зон задержки их роста на среде Мюллера - Хинтона вокруг дисков после инкубации. Диаметр зоны задержки роста измеряют линейкой с точностью до 1 мм, включая диаметр самого диска. По диаметру зон ингибирования микроорганизмы разделяют на чувствительные, средне чувствительные и резистентные.

Результаты антибиотикочувствительности изолята *Campylobacter jejuni* представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Антибиотикочувствительность изолята *Campylobacter jejuni*

| Название антибиотика | | <i>Campylobacter jejuni</i> |
|----------------------|---|-----------------------------|
| | | Зона задержки роста, мм |
| 1 | 2 | 3 |
| 1. | Амикацин AK^{10} | рез. кольцо |
| 2. | Амоксициллин AMX^{10} / Клавулановая кислота | 52 |
| 3. | Ампициллин/Сульбактам $A/S^{10/10}$ | 56 |
| 4. | Левофлоксацин LE^5 | 22 |
| 5. | Моксифлоксацин MO^5 | 28 |
| 6. | Неомицин N^{30} | рез. кольцо |
| 7. | Амфотерицин AP^{100U} | 24 |
| 8. | Тобрамицин TOB^{10} | 24 |
| 9. | Доксициклина гидрохлорид DO^{30} | 24 |
| 10. | Налидиксовая кислота NA^{30} | 20 |
| 11. | Метронидазол MT^5 | – |
| 12. | Хлорамфениколь C^{30} | 20 |
| 13. | Ломефлоксацин LOM^{10} | 54 |
| 14. | Амоксиклав AMC^{30} | 19 |
| 15. | Котримоксазол COT^{25} | – |
| 16. | Ванкомицин VA^{30} | 21 |
| 17. | Ципрофлоксацин 30 мкг | 45 |
| 18. | Ампицилин AMP^{10} | 44 |
| 19. | Эритромицин E^{15} | 49 |
| 20. | Азлоцилин AZ^{75} | 44 |
| 21. | Тетрациклин TE^{30} | 20 |
| 22. | Цефалотин CEP^{30} | 30 |
| 23. | Линкомицин L^2 | 50 |
| 24. | Натриевая соль бензилпенициллина 10 мкг | 48 |
| 25. | Фуразолидон FR^{50} | 16 |
| 26. | Цефоперазон CPZ^{75} | 22 |
| 27. | Офлоксин OF^5 | 21 |
| 28. | Фурагин 30 мкг | 48 |
| 29. | Канамицин K^{30} | – |
| 30. | Фурадонин 30 мкг | 46 |
| 31. | Хлортетрациклин CT^{30} | рез. кольцо |
| 32. | Пристиномицин PM^{15} | 30 |
| 33. | Цефуросим CXM^{30} | 23 |
| 34. | Рокситромицин RO^{30} | 25 |

Продолжение таблицы 2

| 1 | 2 | 3 |
|-----|---|---------------------|
| 35. | Клиндамицин 30 мкг | 50 |
| 37. | Имипенем <i>IPM¹⁰</i> | рез. кольцо |
| 38. | Пенициллин G <i>P¹⁰⁰</i> | 21 |
| 39. | Норфлоксацин 10 мкг | 52 |
| 40. | Спирамицин <i>SR¹⁰⁰</i> | 26 |
| 41. | Сульфадиазин <i>Sz¹⁰⁰</i> | рез. кольцо |
| 42. | Полимиксин-Б <i>Pb^{50U}</i> | рез. кольцо |
| 43. | Фузидисва кислота <i>FC³⁰</i> | 25 |
| 44. | Цефтриаксон 30 мкг | 48 |
| 45. | Карбеницеллин 100 мкг | 20 |
| 46. | Нетимицин 30 мкг | 42 (рез. кольцо 12) |
| 47. | Тобрамицин 10 мкг | 24 |
| 48. | Итраконазол 10 мкг | – |
| 49. | Сизомицин 10 мкг | 22 |
| 50. | Цефазолин 30 мкг | рез. кольцо |
| 51. | Цефтибутен 30 мкг | 17 |
| 52. | Олеандомицин 15 мкг | 24 |
| 53. | Гентамицин 10 мкг | 15 |
| 54. | Колистин <i>CL¹⁰</i> | 19 |
| 55. | Пиперациллин/Газобактум <i>PIT^{100/10}</i> | 15 |
| 56. | Бацитрацин <i>B^{8U}</i> | 20 |
| 57. | Окситетрациклин <i>O³⁰</i> | 24 |
| 58. | Сульфаметизол <i>SM³⁰⁰</i> | рез. кольцо |
| 59. | Сульфафеназол <i>Sr²⁰⁰</i> | 26 |
| 60. | Стрептомицин <i>S¹⁰</i> | 20 (рез. кольцо 32) |
| 61. | Новобиоцин <i>NV³⁰</i> | – |
| 62. | Офлоксацин 5 мкг | 50 |
| 63. | Азитромицин 15 мкг | 48 |
| 64. | Кларитромицин 15 мкг | 22 |
| 65. | Линезолид 30 мкг | 21 |
| 66. | Цефамандол 30 мкг | 15 |
| 67. | Цефтазидим 30 мкг | 12 |
| 68. | Цефепим 30 мкг | 48 |
| 69. | Цефотаксим 30 мг | 49 |
| 70. | Мерепенем 30 мг | 50 |
| 71. | Цефоперазон 30 мг | 52 |
| 72. | Ципрофлоксацин 5 мкг | 23 |
| 73. | Моксифлоксацин 5 мкг | 20 |
| 74. | Цефалексин <i>CN³⁰</i> | 19 |

Проявляет чувствительность к антибиотикам пенициллинового ряда (натриевая соль бензилпенициллина, ампициллин, азлоциллин), макролидов (азитромицин и эритромицин), линкозамидов (линкомицин, клиндамицин), фторхинолонов (ципрофлоксацин, норфлоксацин, ломефлоксацин, офлоксацин), ингибиторов β -лактамазы (сульбактам, клавулановая кислота), антибиотиков нитрофуранового ряда (фурагин и фурадонин), а также некоторых цефалоспоринов (цефотаксим, цефепим, цефоперазон, цефтриаксон и т.д.) и мерепенему.

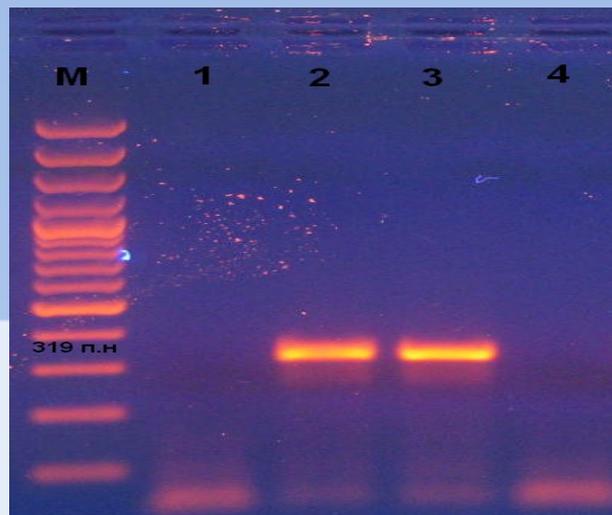
Современные методы молекулярно-генетического анализа, на основе выявления специфических для микроорганизмов нуклеотидных последовательностей ДНК, значительно расширяют возможности выявления в пищевых продуктах трудно культивируемых патогенных микроорганизмов.

Для выполнения ПЦР были использованы два синтетических олигонуклеотидных праймера, подобраны таким образом, что они являются комплементарными двум цепям специфического фрагмента ДНК кампилобактеров разных видов. Правильный выбор олигонуклеотидных праймеров определяет эффективность и воспроизводимость ПЦР.

Разработанные праймеры 16S-F1 и 16S-R2 были созданы в соответствии со всеми требованиями, обладают высокой специфичностью для связывания с участками матричной ДНК, не имеют критической гомологии с другими бактериями и вирусами.

Детекция продуктов ПЦР осуществляется методом электрофореза в агарозном геле при длине амплифицированного специфического фрагмента ДНК *Campylobacter spp.* – 319 п.н.

На рисунке 1 очень ярко светится положительный образец *Campylobacter spp.* (*Campylobacter jejuni*), длина фрагмента 319 п.н. Исследуемый образец *Campylobacter jejuni* дает свечение на данной высоте и поэтому считается положительными.



**Рисунок 1. – Элетрофореграмма выделенного изолята *Campylobacter jejuni*:
М – маркер размера ДНК;
1, 4 – негативный контроль;
2 – позитивный контроль;
3 – исследуемый образец**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактерии изолята на TSA и кампилобакагаре образуют мелкие, гладкие, выпуклые, блестящие, с ровными краями колонии, в ТСБ – равномерное помутнение с формированием серо-белого диска на поверхности среды. НСТА – рост заметен по ходу укола и формирует серо-белый диск на поверхности среды.

Согласно проведенным культурально-морфологическим, биохимическим исследованиям, антибиотикочувствительности и подтверждения в ПЦР выделенный изолят относится к роду *Campylobacter* виду *Campylobacter jejuni*.

После проведенных исследований данный изолят был депонирован в депозитории Национального центра штаммов микроорганизмов Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов под номером 685 и названием *Campylobacter jejuni* RS17.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фотіна, Т.І. Кампілобактеріоз птиці: монографія / Т.І. Фотіна, А.В. Березовський, О.І. Касяненко, Ю.Є. Дворська // Суми: СНАУ, 2010. – 140 с.
2. Інструкція з профілактики та ліквідації кампілобактеріозу птиці: № 1192/19930. – К., 14 жовтня 2011 року.
3. Профилактика кампилобактериоза среди людей: Санитарно-эпидемиологические правила: СП 3.1.7. 2816 – 10. – Москва: постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации, 2010.
4. Prevalence and numbers of *Campylobacter* on broiler carcasses collected at rehang and postchill in 20 U.S. processing plants / M.E. Berrang [et. al.]. // *Journal of Food Protection*. – 2007. – Vol. 70. – P. 1556–1560.
5. Волинець Л.К. Харчові токсикоінфекції / Л.К. Волинець. – К.: Ветеринарна медицина. – 2003. – № 4. – С. 43–44.
6. Инструкция по клинической и лабораторной диагностике кампилобактериоза. – Вологда, 1991.

УДК 619:579.25:616-078:638.15

Черник М.И., кандидат ветеринарных наук
 Радюш И.С., кандидат ветеринарных наук
 Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук
 Дубаневич О.В., старший научный сотрудник

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА ДЕФОРМАЦИИ КРЫЛА ПЧЕЛЫ МЕДОНОСНОЙ (*APIS MELLIFERA L.*) В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Резюме

Сложность диагностики вирусных инфекций пчёл обусловлена отсутствием культур клеток тканей пчелы медоносной, коллекций штаммов вирусов, патогенных для медоносных пчел, и тест-систем для молекулярно-генетической идентификации.

Из всех вирусов обнаруженных у медоносной пчелы *Apis mellifera L.*, наибольшее распространение приобрел вирус деформации крыла. Впервые в Республике Беларусь сотрудниками РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» выделен вирус деформации крыла из тканей пчелы медоносной с использованием первично-трипсинизированной культуры клеток фибробластов эмбрионов кур и проведена его молекулярно-генетическая идентификация.

Summary

The complexity of diagnosing viral infections of bees is due to the lack of cultures of honeybee cells, collections of strains of viruses pathogenic for honeybees and test systems for molecular genetic identification.

Of all the viruses found in the honeybee *Apis mellifera L.*, the deformed wing virus has become the most common. For the first time in the Republic of Belarus, employees of the RUE «Institute of Experimental Veterinary Medicine named S.N. Vyshelisky» isolated a deformed wing virus from the tissues of a honeybee using a primary trypsinized culture of chicken embryo fibroblast cells and carried out its molecular genetic identification.

Поступила в редакцию 01.11.2018 г.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем пчеловодства всего мира в настоящее время являются вирусные заболевания пчёл. Из обнаруженных у медоносной пчелы *Apis mellif-*

era L. двадцати РНК-содержащих вирусов, которые в основном относятся к семействам *Dicistroviridae*, *Iflaviridae* и *Nodaviridae*, наибольшее распространение приобрел вирус деформации крыла – ВДК (defor-