

ГЛАВА 3.9.3.

ИНФЕКЦИЯ САМПУЛОБАКТЕР JEJUNI И C. COLI

РЕЗЮМЕ

Описание заболевания: Микроорганизмы *Sampylobacter jejuni* (*C. jejuni*) и *Sampylobacter coli* (*C. coli*) могут колонизировать кишечник большинства млекопитающих и птиц и являются видами *Sampylobacter*, которые чаще всего выделяют у пациентов с гастроэнтеритом. Хотя основным резервуаром *Sampylobacter* является домашняя птица, передача возбудителя людям лишь частично происходит при обработке и употреблении мяса домашней птицы; другие способы передачи тоже признаны важными. В данной главе рассмотрено место *C. jejuni* и *C. coli* в производстве сырьевых продуктов животноводства с точки зрения безопасности пищевых продуктов.

В норме *Sampylobacter jejuni* и *C. coli* не вызывают клинически проявляющегося заболевания у взрослых животных, кроме отдельных случаев аборта у жвачных животных и очень редких случаев гепатита у страусов. Важным источником имеющего пищевое происхождение заболевания у людей является фекальное загрязнение мяса (в особенности, мяса домашней птицы) во время переработки. У человека возможны некишечные инфекции, включая бактериемию, и некоторые последствия инфекции, например, полинейропатии, хоть и в редких случаях, могут оказаться серьезными.

Идентификация возбудителя болезни: Обнаружение колонизации кишечника у млекопитающих и птиц основано на выделении возбудителя из кала, ректальных мазков или содержимого слепой кишки, либо на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР). *Sampylobacter jejuni* и *C. coli* – термофильные, грамотрицательные, высоко подвижные бактерии, которым для оптимального роста необходимы микроаэробная среда и инкубация при температуре 37-42°C. Для выделения этих бактерий из фекальных/кишечных образцов требуется использовать агаровые среды с селективными антибиотиками. В качестве альтернативного метода, можно воспользоваться высокой подвижностью этих микроорганизмов и использовать для их выделения методы фильтрации. В повседневной практике методы обогащения для обнаружения колонизации кишечника не применяются. Предварительное подтверждение изолятов может быть сделано после изучения морфологии и подвижности бактерий под световым микроскопом. В фазе логарифмического роста *Sampylobacter jejuni* и *C. coli* выглядят как короткие бактерии S-образной формы, в то время как в более старых культурах преобладают кокковидные формы. При изучении методом фазово-контрастной микроскопии обнаруживается характерное быстрое винтообразное движение бактерий. Фенотипическая идентификация основана на реакциях в различных условиях роста. Для определения подлинности штаммов *Sampylobacter* на уровне вида могут применяться биохимические и молекулярные методы анализа, включая ПЦР и MALDI-TOF (времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы). Методы ПЦР могут применяться также для прямой детекции *C. jejuni* и *C. coli*.

Серологические реакции: Серологические реакции не используются в повседневной практике для обнаружения колонизации бактериями *C. jejuni* и *C. coli*.

Требования к вакцинам: Эффективные вакцины для профилактики кишечных инфекций *Campylobacter* у птиц и млекопитающих отсутствуют.

А. ВВЕДЕНИЕ

1. Заболевания

В целом, *Campylobacter jejuni* and *C. coli* считаются симбионтами сельскохозяйственных животных, домашних животных и птиц. В большом количестве выделяют *Campylobacter* у молодых сельскохозяйственных животных с энтеритом, включая поросят, ягнят и телят, но эти микроорганизмы присутствуют также у здоровых животных. Описаны вспышки гепатита у птиц, но *C. jejuni* не является возбудителем этого заболевания, хотя и ассоциирован с ним (Jennings *et al.*, 2011). Недавно был выделен новый представитель рода *Campylobacter*, вызывающий пятнистую болезнь печени у птиц-несушек (Crawshaw *et al.*, 2015). Во многих промышленно развитых странах *Campylobacter* является основной причиной бактериальных заболеваний кишечника у людей (Havelaar *et al.*, 2013; Scallan *et al.*, 2011). Более 80% случаев заболевания вызывает *C. jejuni* и приблизительно 10% случаев вызывает *C. coli*. У человека вызванная *C. jejuni/C. coli* инфекция сопровождается острым энтеритом и болью в животе, которые продолжаются в течение 7 дней или более. Хотя такие инфекции обычно заканчиваются самоизлечением, возможны осложнения, включающие бактериемию, синдром Гийена-Барре, реактивный артрит и аборт (ВОЗ, 2013). Исследования носителя показали, что основным резервуаром *Campylobacter* является домашняя птица, которая становится причиной 50-80% случаев инфекции у человека. В Европейском Союзе (ЕС) приблизительно 30% случаев инфекции у людей связаны с переработкой и употреблением мяса домашней птицы, но передача существенной части штаммов, выделенных из образцов птицы, не связана с мясом птицы, а обусловлено загрязнением окружающей среды (Европейское агентство по безопасности продуктов питания (EFSA), 2010b). Применительно к заболеванию человека другими факторами риска признан контакт с домашними животными и сельскохозяйственными животными, употребление загрязненной воды или сырого молока и поездки в районы с высокой распространенностью заболевания (Domingues *et al.*, 2012). В настоящее время во всем мире внимание организаций, ответственных за пищевую безопасность, сосредоточено на контроле *Campylobacter* в пищевой цепи.

Работы в лаборатории проводить при соблюдении надлежащих процедур биобезопасности и биозащиты, уровень которых определяют посредством анализа биорисков (см. Главу 1.1.4 Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных).

2. Таксономия

В настоящее время различают 34 вида *Campylobacter*, но ожидается что со временем, по мере совершенствования диагностических методик и геномного анализа, это число увеличится (см. Перечень наименований прокариотов и Перечень названий прокариот и их положение в номенклатуре: <http://www.bacterio.net/index.html>). Представители рода *Campylobacter*, как правило, представляют собой граммотрицательные неспорообразующие, S-образные или спиралевидные бактерии (шириной 0,2–0,8 мкм и длиной 0,5–5 мкм), с единственным полярным жгутиком на одном или обоих концах клетки, обеспечивающим характерное винтообразное движение бактерии. Этим бактериям требуется микроаэробные условия, но некоторые штаммы растут также в аэробной или анаэробной среде. Не сбраживают и не окисляют углеводы. Некоторые виды, в частности, *C. jejuni*, *C. coli* и *C. lari*, являются термофильными микроорганизмами, с оптимальным ростом при температуре 42°C. Колонизируют поверхности слизистой оболочки, обычно кишечного тракта, большинства изученных видов млекопитающих и птиц. Вид *C. jejuni* включает два подвида (*C. jejuni* подвид *jejuni* и *C. jejuni* подвид *doylei*) для различения которых могут быть использованы несколько фенотипических тестов (восстановления нитрита, восстановление селенита, тест сфторидом натрия и сафранином) и способности к росту при 42°C (подвид *doylei* не растет при 42°C) (Garrity, 2005). Подвид *jejuni* выделяют намного чаще, чем подвид *doylei*.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследований, применяемые для диагностики *Campylobacter jejuni* и *C. coli* и их назначение

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением	Вклад в политику искоренения	Подтверждение клинических случаев	Надзор за распространением инфекции	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя¹						
Выделение	+++	-	+++	+++	+++	нп
MALDI-TOF	+++	-	+++	+++	+++	нп
Детекция антигена	++	-	++	-	++	нп
Секвенирование 16S рРНК	++	-	++	++	++	нп
ПЦР в реальном времени	++	-	++	++	++	нп
Выявление иммунной реакции: не применимо для <i>Campylobacter jejuni</i> и <i>C. coli</i>						

¹ Для анализа клинического образца рекомендуется использовать сочетание методов идентификации возбудителя.

Пояснение: +++ = рекомендованный метод; ++ = приемлемый метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но применение существенно ограничено стоимостью, достоверностью или другими факторами;
– = не подходит для данной цели; нп = не применимо.

MALDI-TOF = времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы; ПЦР = полимеразная цепная реакция

1. Выделение и идентификация возбудителя

Международной организацией по стандартизации (ISO) предложены две методики обнаружения *Campylobacter*: горизонтальная методика обнаружения и методика подсчета клеток термотолерантных видов *Campylobacter* (ISO 10272) в пищевых продуктах и кормах для животных, состоящая из 2 частей: (Часть 1: «Метод детекции» и Часть 2: «Метод подсчета колоний»). Обе части методики ISO в настоящее время пересматриваются и будут опубликованы в 2017 г. Пересмотренный стандарт будет включать методы выделения *Campylobacter* из живых животных, и методика ISO 17995 касается качества воды и предусматривает выделение из воды и подсчет клеток термотолерантных видов *Campylobacter* (ISO, 2005 – последняя редакция опубликована в 2014 г.).

1.1. Получение образцов

1.1.1. Домашняя птица в птичнике

Домашняя птица часто оказывается колонизирована видом *C. jejuni* (65–95%), реже – видом *C. coli* и еще реже другими видами *Campylobacter* (Newell & Wagenaar, 2000). Уровень колонизации цыплят-бройлеров зависит от возраста. Большинство поголовий до 2-недельного возраста остаются негативными. После возникновения колонизации бактериями *Campylobacter* в поголовье бройлеров происходит исключительно быстрая передача инфекции в результате фекального загрязнения, и в течение нескольких дней возможна колонизация всего поголовья. Поэтому необходимо получить образцы от живых птиц, предназначенных для использования в пищевой цепи, как можно ближе к моменту забоя (Newell & Wagenaar, 2000). Большинство птиц распространяют огромное количество микроорганизмов (в 1 г экскрементов содержится $>10^6$ колониеобразующих единиц *Campylobacter*). Бактерии *Campylobacter* можно выделить из свежих экскрементов/фекального помета или клоакальных мазков. Для достоверной детекции *Campylobacter* посредством бактериального посева следует собрать свежий помет (предпочтительно без следов мочи). Не следует допускать высыхания таких образцов до посева. При использовании мазков следует хранить тампоны в транспортной среде Кэри-Блэра, Амиеса или Стюарта. Рассмотрена стратегия получения образцов у основных видов домашней птицы (Vidal *et al.*, 2013), которая обычно основана на образцах, представляющих собой мазки с поддона, фекальный/фекальный помет или клоакальные мазки.

1.1.2. Крупный рогатый скот, овцы и свиньи на ферме

Представители рода *Campylobacter* часто колонизируют кишечник сельскохозяйственных животных, включая крупный рогатый скот, овец и свиней

(Newell *et al.*). У крупного рогатого скота и овец обычно обнаруживается колонизация видами *C. jejuni*, *C. coli*, *C. hyointestinalis* и *C. fetus*, тогда как у свиней обычно наблюдается колонизация *C. coli*. Уровень колонизации молодых животных выше, чем старых. У старых животных микроорганизмы периодически обнаруживаются в фекалиях, вероятно, из-за небольшого количества или непостоянного выделения возбудителя. Следует получить свежие образцы (по возможности, ректальные) и не допускать их высыхания. В случае использования мазков на тампонах необходимо использовать транспортную среду (например, Кэри-Блэра, Амиеса или Стюарта).

1.1.3. При забое

Для обнаружения микроорганизмов рода *Campylobacter* у домашней птицы обычно используют слепую кишку. Слепую кишку можно вырезать стерильными ножницами из остальной части кишечника и направить целиком в лабораторию в надлежащем контейнере.

Для получения образцов кишечника крупного рогатого скота, овец и свиней следует асептически вскрыть стенку кишки или получить сохранные ректальные мазки.

1.2. Транспортировка и обработка образцов

1.2.1. Транспортировка

Бактерии рода *Campylobacter* чувствительны к условиям окружающей среды, включая обезвоживание, атмосферный кислород, солнечный свет и повышенную температуру. Поэтому следует как можно быстрее транспортировать образцы в лабораторию с последующей обработкой, предпочтительно в тот же день, но не позднее чем в течение 3 дней. Образцы следует защищать от света, экстремальных температур и высыхания.

Рекомендации по идеальной температуре транспортировки отсутствуют, но ясно, что замораживание или высокие температуры могут снизить жизнеспособность бактерий. Следует избегать высоких температур (>20°C), низких температур (<0°C) и флуктуаций температуры. Когда время между получением и обработкой образцов превышает 48 часов рекомендуется хранить образцы при температуре 4°C (±2°C).

1.2.2. Транспортные среды

Мазки/тампоны: При получении мазков с поддона или ректальных мазков рекомендуется использовать имеющиеся в продаже транспортные пробирки, содержащие соответствующую среду, например, среду Кэри-Блэра или Амиеса.

Такая среда может быть приготовлена на простом агаре или угольном агаре. Такая среда предназначена не для поддержки роста *Campylobacter*, но для защиты содержимого тампонов от высыхания и токсичного воздействия кислорода.

В тех случаях, когда можно получить лишь небольшие количества фекальных/цекальных образцов и транспортные пробирки отсутствуют, рекомендуется перевозить образцы в транспортной среде. Описано несколько транспортных сред: среда Кэри-Блэра, модифицированная среда Кэри-Блэра, модифицированная среда Стюарта,

кампитиогликолятная среда, щелочная пептонная вода и полужидкая среда для теста на подвижность. Описаны хорошие результаты выделения при использовании среды Кэри-Блэра (Luechtefeld *et al.*, 1981; Sjogren *et al.*, 1987).

1.2.3. Поддержание образцов

После доставки в лабораторию следует как можно раньше обработать образцы, предпочтительно в день доставки, но не позднее чем через 3 суток после получения образцов. Для того чтобы не допустить изменений температуры, образцы следует замораживать только при невозможности обработки их в тот же день; при наличии такой возможности образцы следует хранить при комнатной температуре. Если образцы при транспортировке или в лаборатории хранились при температуре 4°C, перед дальнейшей обработкой следует уравновесить их до достижения комнатной температуры, чтобы не допустить температурного шока.

1.3. Выделение *Campylobacter*

Для выделения бактерий *Campylobacter* из фекальных/цекальных или кишечных образцов предварительная обработка не требуется; образцы можно посеять на селективную среду, либо возможно использование метода фильтрования с посевом на неселективный агар. В случае цекальных образцов слепую кишку асептически вскрывают, отрезая конец стерильными ножницами и выдавливая из кишки подлежащий обработке материал. Для повышения чувствительности культуры потенциально чувствительных к вызываемому окружающей средой стрессу микроорганизмов или при низком содержании микроорганизмов в фекалиях, например, крупного рогатого скота, овец или свиней, рекомендуется выполнить обогащение. Однако в повседневной практике обогащение фекальных образцов не выполняют, поскольку оно обычно сопровождается избыточным ростом конкурирующих бактерий.

1.3.1. Селективные среды для выделения

Для извлечения *Campylobacter* можно использовать разные среды. Наиболее часто рекомендуемыми средами являются модифицированная агаровая среда с активированным углем, цефоперазоном и дезоксихолатом (mCCDA), хотя возможно также использование альтернативных сред. Имеется подробное описание детекции *Campylobacter* в культуре и разнообразных используемых для этого сред (Corry *et al.*, 1995; 2003). Селективные среды можно разделить на две группы: среды, содержащие кровь, и среды, содержащие активированный уголь. Компоненты крови и активированный уголь добавляют для удаления токсичных производных кислорода. Большинство сред выпускаются серийно и присутствуют в продаже. Селективность среды определяется используемыми антибиотиками. Используют цефалоспорин (как правило, цефоперазон), в некоторых случаях в комбинации с другими антибиотиками (например, ванкомицином, триметопримом). Для подавления дрожжевых и плесневых клеток используют циклогексимидин (актидидион) и в последнее время также амфотерицин В (Martin *et al.*, 2002). Основное различие между средами заключается в подавлении контаминирующей микрофлоры. Все используемые для селекции вещества не препятствуют росту *C. jejuni* и *C. coli*. Нет ни одной среды, которая поддерживала бы рост *C. jejuni* и подавляла бы рост *C. coli*, и наоборот. Большинство сред будут также

поддерживать некоторый рост других видов рода *Campylobacter* (например, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. fetus* и *C. hyointestinalis*), особенно при менее селективной температуре 37°C.

Примеры селективных твердых сред, содержащих компоненты крови:

- i) Агар Престона
- ii) Агар Скирроу
- iii) Агар Бацлера
- iv) Кампи-цефекс агар

Примеры селективных твердых сред, содержащих активированный уголь

- i. mCCDA (модифицированная агаровая среда с активированным углем, цефоперазоном и дезоксихолатом), незначительно модифицированная версия первоначально описанной среды CCDA) (Bolton *et al.*, 1984; 1988)
- ii. Агар Кармали или селективная агаровая среда с активированным углем (CSM) (Karmali *et al.*, 1986)
- iii. САТ-агар (агаровая среда с цефоперазоном, амфотерицином и тейкопланином), поддерживающая рост *C. upsaliensis* (Aspinall *et al.*, 1993).

1.3.2. Пассивное фильтрование

Метод пассивного фильтрования избавляет от необходимости использования селективных сред (Steele & McDermott, 1984); поэтому он очень удобен для выделения видов *Campylobacter*, чувствительных к антибиотикам. Поскольку этот метод не требует использования дорогостоящих селективных сред, им могут воспользоваться лаборатории с ограниченным бюджетом. Для пассивного фильтрования фекалии смешивают с фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) (приблизительно разведение 1/10), чтобы получить суспензию. Затем приблизительно 100 мкл этой суспензии аккуратно накладывают на фильтр с размером пор 0,45–0,65 мкм, предварительно размещенный на поверхности разлитого в чашки неселективного содержащего кровь агара. Необходимо действовать с осторожностью, чтобы не допустить утечки инокулята через край фильтра. Фильтр выдерживают в течение 30–45 минут при 37°C или комнатной температуре для миграции бактерий через фильтр, после чего фильтр удаляют. Чашку инкубируют в микроаэробных условиях при температуре 42°C.

1.3.3. Инкубация

- i) Атмосфера

Для оптимального роста *Campylobacter* требуется микроаэробная атмосфера, содержащая 5–10% кислорода и 5–10% углекислого газа (Corry *et al.*, 2003; Vandamme, 2000). Для создания соответствующих атмосферных условий могут быть использованы разные методы. В некоторых лабораториях (неоднократно) создают разрежение в эксикаторе с последующим замещением атмосферы баллонными газами. В продаже

имеются газогенераторные наборы. При работе с многочисленными культурами возможно также использование инкубаторов, в которых созданы разные атмосферы.

ii) Воздушная среда

Среды можно инкубировать при температуре 37°C или 42°C, чтобы минимизировать рост контаминирующих микроорганизмов и создать селективные условия для оптимального роста *C. jejuni* и *C. coli*. Для того чтобы не допустить рост дрожжевых и плесневых клеток при 37°C, добавляют фунгистатические препараты циклогексимидин или амфотерицин (Bolton *et al.*, 1988). В некоторых лабораториях инкубацию выполняют при температуре 41,5°C, для того чтобы гармонизировать ее с протоколами выделения *Salmonella* и *Escherichia coli* O157 (ISO, 2006).

iii) Время

При инкубации при температуре 42°C рост *Campylobacter jejuni* и *C. coli* обычно обнаруживается через 24–48 часов. Поскольку более длительная инкубация приводит к очень незначительному увеличению численности позитивных образцов, для рутинной диагностики рекомендуемая продолжительность инкубации составляет 48 часов (Bolton *et al.*, 1988).

1.4. Подтверждение

Для подтверждающих тестов необходима чистая культура, но предварительное подтверждение может быть выполнено прямым изучением подозрительного материала колоний под микроскопом.

1.4.1. Идентификация на твердой среде

На агаре Скирроу или других содержащих кровь агаровых средах *Campylobacter* образует характерные светло-розовые, округлые, выпуклые, гладкие и блестящие колонии с ровным краем. На средах, содержащих активированный уголь, например, mCCDA, характерные колонии имеют сероватый цвет, плоские и влажные, с тенденцией к распространению и могут иметь металлический блеск.

1.4.2. Микроскопическое исследование морфологии и подвижности

Материал подозрительной колонии суспендируют в физиологическом растворе и изучают, предпочтительно, с помощью фазово-контрастного микроскопа, под которым бактерии *Campylobacter* видны как характерные спиральные или изогнутые тонкие палочки с характерным винтообразным движением. В других культурах преобладают менее подвижные кокковидные формы.

1.4.3. Детекция оксидазы

Отбирают материал подозрительной колонии и помещают его на фильтровальную бумагу, смоченную оксидазным реагентом. Появление в течение 10 секунд фиолетового или темно-синего окрашивания означает положительную реакцию. В случае использования коммерческого набора для оксидазного теста следует инструкциям производителя.

1.4.4. Аэробный рост при 25°C

Чистой культурой инокулируют разлитую по чашкам неселективную, содержащую кровь агаровую среду и инкубируют при температуре 25°C в аэробной атмосфере в течение 48 часов.

1.4.5. Реакции латекс-агглютинации

В продажу поступают диагностические наборы для подтверждения чистоты культур *C. jejuni* и *C. coli* (часто также *C. lari*) методом латекс-агглютинации.

1.5. Идентификация *Campylobacter* на уровне вида

Среди изолятов *Campylobacter* из образцов животного происхождения, растущих при 42°C, чаще всего встречающимися видами являются *C. jejuni* и *C. coli*. Однако описаны и встречающиеся с низкой частотой другие виды, включая вид *Helicobacter*. В большинстве случаев *C. jejuni* можно отличить от других видов рода *Campylobacter* по гидролизу гиппурата, поскольку *C. jejuni* – единственный гиппурат-позитивный вид, выделенный из ветеринарных образцов и пищевых образцов. Описано присутствие гиппурат-негативных штаммов *C. jejuni* (Steinhauseroва *et al.*, 2001). В Таблице 2 показаны некоторые основные классические фенотипические характеристики наиболее важных термофильных видов рода *Campylobacter* (ISO, 2006). В литературе описаны также более широкоохватной идентификации видов (On, 1996; Vandamme, 2000). Для подтверждения идентификации следует использовать установленные положительные и отрицательные контрольные образцы.

Таблица 2. Основные фенотипические характеристики отдельных термофильных видов рода Campylobacter

Характеристики	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Гидролиз гиппурата	+	-	-
Гидролиз индолилацетата	+	+	-

Пояснение: + = позитивный; - = негативный; * не все штаммы.

В Таблице 3 представлены тесты, подтверждающие присутствие термофильных видов *Campylobacter*, и интерпретация этих тестов (ISO, 2006) Для подтверждения идентификации следует использовать установленные положительные и отрицательные контрольные образцы.

Таблица 3. Подтверждающие тесты, применяемые при определении термофильных видов рода *Campylobacter*

Подтверждающие тесты	Результаты в присутствии термофильных видов <i>Campylobacter</i>
Морфология	Небольшие извитые бациллы
Подвижность	Характерное (высокая подвижность, винтообразное движение)
Оксидаза	+
Аэробный рост при 25 ⁰ С	-

1.5.1. Обнаружение гидролиза гиппурата

Материал выросшей подозрительной колонии в количестве, помещающемся на бактериологической петле, суспендируют в 400 мкл 1% раствора гиппурата натрия (отобранный материал не должен включать агар). Инкубируют при 37⁰С в течение 2 часов, затем медленно добавляют 200 мкл 3,5% раствора нингидрина по стенке пробирки, чтобы создать верхний слой. Повторно инкубируют при 37⁰С в течение 10 минут и регистрируют результат реакции. Позитивная реакция: темно-пурпурная/синяя окраска. Негативная реакция: прозрачный или серый раствор. В случае использования коммерческих дисков для обнаружения гидролиза гиппурата следуют инструкциям производителя.

1.5.2. Обнаружение гидролиза индоксилацетата

Подозрительную колонию помещают на диск с индоксилацетатом и добавляют каплю стерильной дистиллированной воды. Если происходит гидролиз индоксилацетата, то в течение 5–10 минут цвет изменяется на темно-синий. Если изменения окраски не происходит, то гидролиз отсутствует. В случае использования коммерческих дисков для обнаружения гидролиза индоксилацетата следуют инструкциям производителя.

Биохимическую идентификацию можно дополнить или заменить идентификацией с использованием молекулярных методов или методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. Метод MALDI-TOF можно использовать для быстрой и эффективной идентификации изолятов *Campylobacter* на уровне рода и видов (Bessede *et al.*, 2011). Описаны разнообразные методы анализа, основанные на использовании ДНК-зондов и полимеразной цепной реакции, которые позволяют идентифицировать виды *Campylobacter* (On, 1996; Vandamme, 2000). Имеется выполненная оценка специфичности 11 методов ПЦР-анализа, применяемых для идентификации *C. jejuni* и *C. Coli* (On & Jordan, 2003). Дуплексный вариант ПЦР в реальном времени, мишенью которого является ген *mapA* в случае идентификации *C. jejuni* или ген *SeuE* в случае идентификации *C. coli*, позволяет быстро различить штаммы *C. jejuni* и *C. coli* (Best *et al.*, 2003). Имеется также другой метод ПЦР в реальном времени, обычно используемый для идентификации и различения *C. jejuni*, *coli* и *lari* (Mayr, 2010). Для различения *C. jejuni*,

C. coli, *C. lari* и *C. upsaliensis*, обычно используют метод разделения в геле (Wang *et al.*, 2002).

Метод секвенирования 16S рРНК позволяет также идентифицировать изоляты *Campylobacter* на уровне вида (Gorkiewicz *et al.*, 2003).

1.6. Детекция *Campylobacter* молекулярными методами

В литературе широко описаны методы ПЦР, применяемые для обнаружения *Campylobacter* в фекальных образцах животных и обогащенных образцах мяса (Bang *et al.*, 2001; Lund *et al.*, 2003; Olsen *et al.*, 1995). Существует множество молекулярных тестов для идентификации видов рода *Campylobacter*, но среди них нет единственного, который признан рекомендованным. Для идентификации микроорганизма на уровне вида в изолятах *Campylobacter* может быть использован метод секвенирования 16S рРНК (Gorkiewicz *et al.*, 2003). При использовании всех молекулярных методов детекции *Campylobacter* необходимо включать в эксперимент положительные и отрицательные референтные штаммы и контроль анализа, чтобы иметь возможность обнаружить ингибирование реакции ПЦР матриксом образца.

1.7. Тесты, основанные на «антигенной ловушке»

Для обнаружения *Campylobacter* в образцах кала человека и животных применяются методы ферментативного иммуноанализа. Некоторые из них представляют собой иммунохроматографический анализ на тест-полосках. Необходимо критически оценивать чувствительность и специфичность таких методов, выполняя их внутреннюю валидацию.

2. Серологические исследования

В повседневной практике для обнаружения колонизации сельскохозяйственных животных *C. jejuni*/*C. coli* серологические методы анализа не применяются.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОПРЕПАРАТАМ

Вакцины, разработанные против инфекции *C. jejuni* или *C. coli* у птиц или животных, не существуют.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ASPINALL S.T., WAREING D.R.A., HAYWARD P.G. & HUTCHINSON D.N. (1993). Selective medium for thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. *J. Clin. Pathol.*, **46**, 829–831.

BANG D.D., PEDERSEN K. & MADSEN M. (2001). Development of a PCR assay suitable for *Campylobacter* spp. mass screening programs in broiler production. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.*, **9**, 97–113.

BESSEDE E., SOLECKI O., SIFRE E., LABADI L. & MEGRAUD F. (2011). Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.*, **17**, 1735–1739.

BEST E.L., POWEL E.J., SWIFT C., KATHLEEN A.G. & FROST J.A. (2003). Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiol.*, **229**, 237–241.

BOLTON F.J., HUTCHINSON D.N. & COATES D. (1984). Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces. *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 169–171.

BOLTON F.J., HUTCHINSON D.N. & PARKER G. (1988). Reassessment of selective agars and filtration techniques for isolation of *Campylobacter* species from faeces. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **7**, 155–160.

CORRY J.E.L., ATABAY H.I., FORSYTHE S.J. & MANSFIELD L.P. (2003). Culture media for the isolation of campylobacters, helicobacter and arcobacters. *In: Handbook of Culture Media for Food Microbiology*, Second Edition, Corry J.E.L., Curtis G.D.W. & Baird R.M. eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 271–315.

CORRY J.E.L., POST D.E., COLIN P. & LAISNEY M.J. (1995). Culture media for the isolation of campylobacters. *Int. J. Food Microbiol.*, **26**, 43–76.

CRAWSHAW T.R., CHANTER J.I., YOUNG S.C., CAWTHRAW S., WHATMORE A.M., KOYLASS M.S., VIDAL A.B., SALGUERO F.J. & IRVINE R.M. (2015). Isolation of a novel thermophilic *Campylobacter* from cases of spotty liver disease in laying hens and experimental reproduction of infection and microscopic pathology. *Vet. Microbiol.*, **179**, 315–321.

DOMINGUES A.R., PIRES S.M., HALASA T. & HALD T. (2012). Source attribution of human campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. *Epidemiol. Infect.*, **140**, 970–981.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2010b). Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA J.*, **8**, 1437. [89 pp.].

GARRITY G.M. (Editor-in-Chief) (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition. Springer-Verlag, New York, USA.

GORKIEWICZ G., FEIERL G., SCHOBER C., DIEBER F., KÖFER J., ZECHNER R. & ZECHNER E.L. (2003). Species-specific identification of *Campylobacter*s by partial 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2537–2546.

HAVELAAR A.H., IVARSSON S., LÖFDAHL M. & NAUTA M.J. (2013). Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. *Epidemiol. Infect.*, **141**, 293–302.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (2005). ISO 17995:2005. Water quality – Detection and enumeration of thermophilic *Campylobacter species*. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (2006). ISO 10272-1:2006 AND ISO/TS 10272-2:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method; Part 2: Colony count technique. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.

JENNINGS J.L., SAIT L.C., PERRETT C.A., FOSTER C., WILLIAMS L.K., HUMPHREY T.J. & COGAN T.A. (2011). *Campylobacter jejuni* is associated with, but not sufficient to cause vibronic hepatitis in chickens. *Vet. Microbiol.*, **149**, 193–199.

KARMALI M.A., SIMOR A.E., ROSCOE M., FLEMING P.C., SMITH S.S. & LANE J. (1986). Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 456–459.

LUECHTEFELD N.W., WANG W.L., BLASER M.J. & RELLER L.B. (1981). Evaluation of transport and storage techniques for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from turkey cecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **13**, 438–443.

LUND M., WEDDERKOPP A., WAINO M., NORDENTOFT S., BANG D.D., PEDERSEN K., & MADSEN M. (2003). Evaluation of PCR for detection of *Campylobacter* in a national broiler surveillance programme in Denmark. *J. Appl. Microbiol.*, **94**, 929–935.

MARTIN K.W., MATTICK K.L., HARRISON M. & HUMPHREY T.J. (2002). Evaluation of selective media for *Campylobacter* isolation when cycloheximide is replaced with amphotericin B. *Let. Appl. Microbiol.*, **34**, 124–129.

MAYR A.M., LICK S., BAUER J., THARIGEN D., BUSCH U. & HUBER I (2010). Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* in food, using multiplex real-time PCR. *J. Food Prot.*, **73**, 241–250.

NEWELL D.G., MUGHINI-GRAS L., KALUPAHANA R.S. & WAGENAAR J.A. (2017). *Campylobacter* epidemiology – sources and routes of transmission for human infection. *Campylobacter: Features, Detection, and Prevention of Foodborne Disease*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

NEWELL D.G. & WAGENAAR J.A. (2000). Poultry infections and their control at the farm level. In: *Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 497–509.

OLSEN J.E., ABO S., HILL W., NOTERMANS S., WERNARS K., GRANUM P.E., POPVIC T., RASMUSSEN H.N. & OLSVIK O. (1995). Probes and polymerase chain reaction for the detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 1–78.

ON S.L.W. (1996). Identification methods for Campylobacters, Helicobacters, and Related organisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, **9**, 405–422.

ON S.L.W. & JORDAN P.J. (2003). Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 330–336.

SCALLAN E., HOEKSTRA R.M., ANGULO F.J., TAUXE R.V., WIDDOWSON M.A., ROY S.L., JONES J.L., GRIFFIN P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, **17**, 7–15.

SJOGREN E., LINDBLOM G.B. & KAIJSER B. (1987). Comparison of different procedures, transport media, and enrichment media for isolation of *Campylobacter* species from healthy laying hens and humans with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 1966–1968.

STEELE T.W. & MCDERMOTT S.N. (1984). The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology*, **16**, 263–265.

STEINHAUSEROVA I., CESKOVA J., FOJTIKOVA K. & OBROVSKA I. (2001). Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 470–475.

VANDAMME P. (2000). Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In: *Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 3–26.

VIDAL A.B., RODGERS J., ARNOLD M. & CLIFTON-HADLEY F. (2013). Comparison of different sampling strategies and laboratory methods for the detection of *C. jejuni* and *C. coli* from broiler flocks at primary production. *Zoonoses Public Health*, **60**, 412–425.

WANG G., CLARK C.G., TAYLOR T.M., PUCKNELL C., BARTON C., PRICE L., WOODWARD D.L. & RODGERS F.G. (2002). Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 4744–4747.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2013). The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9–11 July 2012, WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Organisation for Animal Health, eds. WHO, Geneva, Switzerland.

<http://www.who.int/iris/handle/10665/80751>

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по диагностике кампилобактериоза (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий:

<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Для получения более подробной информации, касающейся тестов и реагентов для

диагностики кампилобактериоза, просим Вас обращаться в Референтные лаборатории
МЭБ.

NB: Первая версия принята в 2004 году. Последние версии с изменениями приняты в 2017
году.