

УДК 636.09:579.63:303.64:579.84

ПУСТОВІТ Н. А., аспірант, e-mail: nadiapustovit@gmail.com

ПНЧУК Н.Г., канд.вет.наук, e-mail: pinchuk.2578@gmail.com

КУДРЯВЧЕНКО О.П., канд.вет.наук, e-mail: kudryavchenko@biocontrol.com.ua

Державний науково – контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ІЗОЛЯТІВ *CAMPYLOBACTER* ВИДІЛЕНИХ З ПРОДУКТІВ ПТАХІВНИЦТВА

Кампілобактеріоз – це група зоонозних інфекцій, що викликаються бактеріями, які належать до роду *Campylobacter*. У людини протікають переважно в гострій формі захворювання і характеризуються ураженням шлунково-кишкового тракту, з тенденцією до генералізації процесу з розвитком септицемії і ураженням різних органів і систем. Захворюваність на кампілобактеріоз реєструється у вигляді спорадичних випадків, епідемічних вогнищ з харчовим і водним шляхом передачі інфекції. У деяких країнах кампілобактеріоз є провідним етіологічним агентом гострих кишкових інфекцій, випереджаючи сальмонельози і шигельози.

Ключові слова: кампілобактер, розповсюдження, кишкова інфекція, електронна мікроскопія.

Вступ. Удосконалення методів аналізу харчових продуктів на наявність в них збудників гострих кишкових інфекцій (ГКІ), в тому числі бактерій роду *Campylobacter spp.* - одна з найбільш актуальних задач гігієни харчування. Ця задача диктується необхідністю включення мікробіологічних досліджень в систему профілактики ГКІ, а також проведення моніторингу патогенних мікроорганізмів у харчових продуктах.

Кампілобактеріоз є найбільш поширеним патогеном, який пов'язаний з кишковими інфекціями людини в Європейському Союзі (ЄС) та світі [1]. Тому *Campylobacter* є першо-черговою причиною розвитку бактеріального ентериту у всьому світі. У 2013 році в ЄС було зареєстровано 64,8 підтверджених випадків кампілобактеріозу на 100 000 жителів, що перевищує кількість випадків сальмонельозу із частотою сповіщення 20,4 на 100 000 населення [2].

У США цей патоген був другим за загальновідомим бактеріальним патогеном (сальмонельоз) з 6621 інфекцією в 2013 році та захворюваністю 13,82 випадків на 100 000 населення [3].

Кампілобактеріоз також може призвести до ускладнень після інфекції, таких як синдром Гієна-Барре (GBS) та його варіант, синдром Міллера Фішера (MFS), хронічна та потенційно смертельна форма паралічу [4,5].

В умовах складної епізоотичної ситуації, особливо з появою нових інфекцій зі складною етіологією, зростає значення своєчасної діагностики та специфічної профілактики захворювань тварин. Останнім часом значно розширилися можливості використання електронної мікроскопії (ЕМ) як оперативного методу виявлення збудників хвороб.

Метою роботи було електронно-мікроскопічне дослідження ізолятів *Campylobacter* виділених з продуктів птахівництва.

Матеріали і методи досліджень. Виділені ізоляти культивували на щільному кров'яному середовищі (Колумбійський агар з додаванням 10% дефібрированої овечої крові). Культивували при температурі 37°C та 7% CO₂ 48-72 год.

Виділені ізоляти відбирали з культуральних середовищ та емульгували у фосфатно-буферному фізіологічному розчині. Потім готували матеріал згідно методик прямої електронної мікроскопії.

Результати досліджень. Вибір методу підготовки матеріалу з метою виготовлення з нього препаратів для електронно-мікроскопічного дослідження залежить від концентрації мікроорганізму в суспензії, ступеня її забруднення сторонніми баластними речовинами та морфології збудника. Концентрація бактеріальної маси не повинна бути меншою, ніж 10^6 часточок в 1 см^3 суспензії.

Процес електронно-мікроскопічної індикації збудника складається з декількох послідовно виконаних операцій:

- відбір патологічного матеріалу та готової суспензії мікроорганізму збудника для електронно-мікроскопічних досліджень;
- підготовка матеріалу до електронно-мікроскопічного дослідження;
- нанесення досліджуваного матеріалу на плівку-підложку електронно-мікроскопічної сітки і фарбування (контрастування) препаратів;
- дослідження виготовлених препаратів за допомогою електронного мікроскопу.

За основу було взято використання прямої електронної мікроскопії досліджуваних матеріалів.

Незважаючи на те, що *Campylobacter* зазвичай демонструє викривлену або спіральну морфологію, в старих культурах переважають коккові форми, особливо на твердих середовищах. Першим етапом нашої роботи був відбір матеріалу для електронно-мікроскопічних досліджень. В якості матеріалу були використані ізоляти кампілобактерій виділені від продуктів птахівництва, які були досліджені за культурально-морфологічними та біохімічними властивостями і чутливістю до антимікробних препаратів.

Виділені ізоляти культивували на щільному кров'яному середовищі (Колумбійський агар з додаванням 10% дефібрированої овечої крові). Культивували при температурі 37°C та 7% CO_2 48-72 год. Виділені ізоляти відбирали з культуральних середовищ та емульгували у фосфатно-буферному фізіологічному розчині.

У випадку, коли концентрація мікроорганізму в досліджуваному матеріалі, є недостатньою для його прямої індикації в полі зору електронного мікроскопу, або морфологічні контури не зовсім чіткі, виникає необхідність додатково очищати й концентрувати такий матеріал [6].

Для негативного контрастування біологічних об'єктів застосовували: 2-4% водяний розчин фосфорно-вольфрамової кислоти (ФВК), рН - 6,8.

Подальшим етапом було нанесення на плівку-підложку електронно-мікроскопічної сіточки нативного досліджуваного матеріалу після його мінімального процесу підготовки. Увесь процес приготування препарату із такого матеріалу для електронно-мікроскопічного дослідження займає кілька годин з моменту його відбору.

Найбільш рекомендований при роботі з неочищеними чи частково очищеними суспензіями є флотаційний метод приготування препаратів. Для цього краплю суспензії наносять на пластинку з воску і на неї на 2-5 хв. для адсорбції мікроорганізму на плівку поміщають плівкою-підкладкою вниз опорну сітку. Потім надлишок рідини на сітці видаляють фільтрувальним папером і сітку поміщають на 30-50 с на краплю контрастуючого розчину (3% ФВК при рН- 6,8) і його надлишок видаляють фільтрувальним папером. Інколи, у випадку недостатньої чистоти суспензії, для видалення баластових речовин з поверхні сітки, де уже адсорбувався збудник, її промивають шляхом поміщення препарату плівкою-підкладкою вниз на 1-2 краплі дистильованої води з послідуочим видаленням надлишку води фільтрувальним папером і контрастуванням.

Виготовлені препарати досліджували під електронним мікроскопом із роздільною здатністю 3-5 ангстрем при інструментальному збільшенні від 20 тис. до 40 тис. разів, переглядаючи не менше 15 вікон предметної сітки.

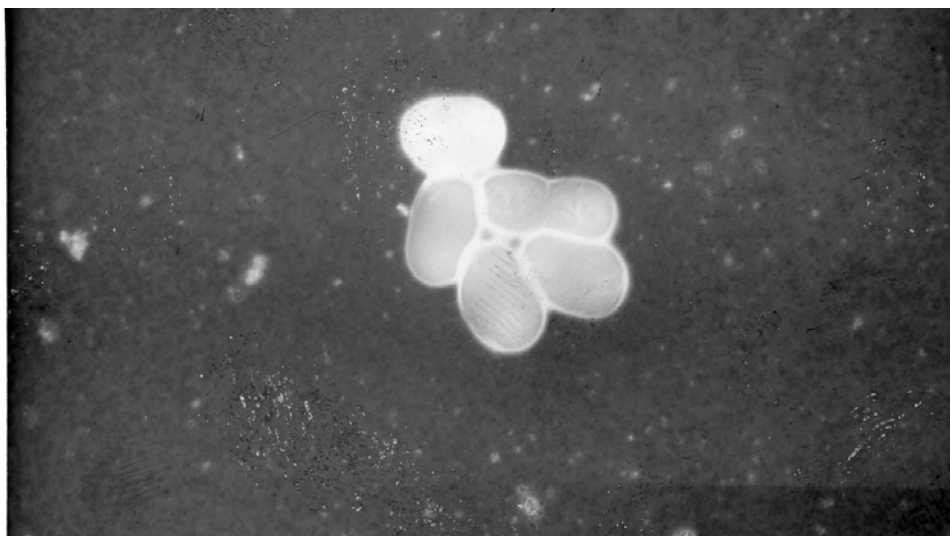


Рис. 1 Морфологія *Campylobacter jejuni* електронним мікроскопом ПЕМ-125К, збільшення 20 000.

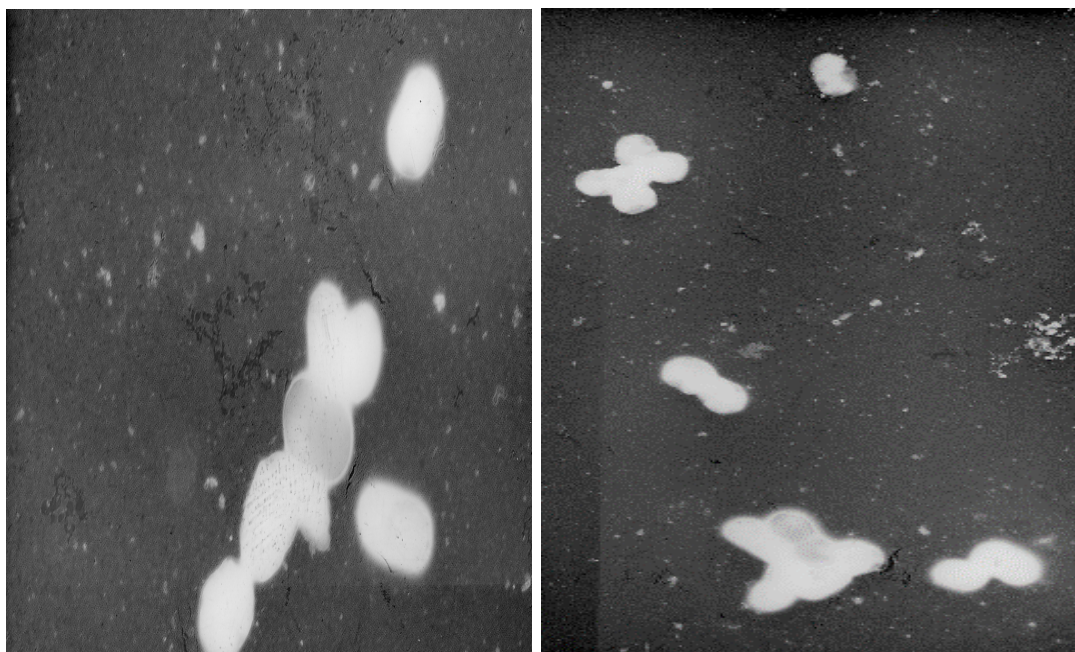


Рис. 2, 3. Кокова форма *Campylobacter jejuni* після культивування 72 год.

Всі *Campylobacter spp.* існують у різних морфологічних формах. Як видно з електронно-мікроскопічних фотографій, клітини неоднорідні за віком та фізіологічним станом. На периферії колонії клітини активно зростають, тоді як у центрі та на верхній поверхні колонії поживні речовини менш доступні, і клітини, швидше за все, старі та неактивні. Переважають кокові форми, що свідчить про те, що ці форми представляють відповідно активно зростаючі та неактивні клітини.

Campylobacter - це мікроорганізм, який важко культивувати, і який знижує свою життєздатність при культивуванні *in vitro*, здатний вижити в навколишньому середовищі для того, щоб бути бактеріальним патогеном який часто виділяють з продуктів харчування та викликати харчові токсикоінфекції.

Тому можна сказати, що удосконалення методів аналізу харчових продуктів на наявність в них збудників гострих кишкових інфекцій (ГКІ), в тому числі бактерій роду *Campylobacter spp.* - одна з найбільш актуальних задач гігієни харчування. А даний метод можна використовувати під час інтерпретації як результатів діагностичних досліджень, так і при ідентифікації в процесі отримання відповідних матеріалів.

Висновки та перспективи подальших досліджень. За допомогою електронної-мікроскопії було проведено морфологічне дослідження ізолятів кампілобактерій виділених з продуктів птахівництва.

Деякі дослідники представляли кокові форми як альтернативну фізіологічну стадію організму, інші представили докази, принаймні для *C. jejuni*, що ці форми мають меншу життєздатність і, ймовірно, являють собою вироджений стан [7]. Отже кокові форми є виродженим етапом, та виникають внаслідок несприятливих умов. Наше спостереження припускає прогресуючу зміну мікроорганізму, пов'язану з дегенерацією клітинної стінки та зміною умов культивування, що дає змогу проводити подальші дослідження у цьому напрямку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Rautelin, H., and M. L. Hanninen. *Campylobacters: the most common bacterial enteropathogens in the Nordic countries* // *Ann. Med.* – 2000. – 32. – pp. 440–445.
2. European Food Safety Authority—EFSA. *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013* // *EFSA J.*, 2015. – 13. – pp 3991–4153.
3. Center for Disease Control and Prevention—CDC. *In: Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food* // *Foodborne Diseases Active Surveillance Network*, 10 U.S.—2014. – 63. – pp 328–332.
4. Altekruuse SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis.* 1999;5:28–35.
5. Kuwabara S. Does *Campylobacter jejuni* infection elicit axonal or demyelinating Guillaine Barré syndrome, or both // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2011. – 82. – p. 238.
6. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. – Перевод с англ. И.В. Викторова – М.: Мир, 1972 – 320 с.
7. Smibert, R. M. *The genus Campylobacter* // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1978. – 32. – pp. 674-709.

ЭЛЕКТРОННО - МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОЛЯТОВ САМПУ-ЛОВАСТЕР ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРОДУКТОВ ПТИЦЕВОДСТВА / Пустовит Н. А., Пинчук Н. Г., Кудрявченко А. П.

Кампилобактериоз - это группа зоонозных бактериальных инфекций, вызываемых бактериями, которые принадлежат к роду Campylobacter. У человека протекает преимущественно в острой форме заболевания и характеризуются поражением желудочно-кишечного тракта, с тенденцией к генерализации процесса с развитием септицемии и поражением различных органов и систем. Возбудители кампилобактериоза широко распространены в природе. Заболеваемость кампилобактериоз регистрируется в виде sporadических случаев, эпидемических очагов с пищевым и

водным путем передачи инфекции. В некоторых странах кампилобактериоз является ведущим этиологическим агентом острых кишечных инфекций, опережая сальмонеллез и шигеллез.

Ключевые слова: кампилобактериоз, распространение, кишечная инфекция, электронная микроскопия.

INVESTIGATION THE ULTRASTRUCTURE OF ISOLATES *CAMPILOBACTER ISOLATED FROM POULTRY PRODUCTS* / Pustovit N. A., Pinchuk N. G., Kudryavchenko A. P.

Introduction. Campylobacteriosis is a group of zoonotic bacterial infections caused by bacteria belonging to the genus *Campylobacter*. In humans, they occur mainly in the acute form of the disease and are characterized by lesions of the gastrointestinal tract, with a tendency to generalize the process with the development of septicemia and the defeat of various organs and systems. Pathogens of Campylobacteriosis are widespread in nature. The incidence of Campylobacteriosis is recorded in the form of sporadic cases, epidemic foci with food and water through the transmission of infection. In some countries, Campylobacteriosis is a leading etiological agent of acute intestinal infections, ahead of *Salmonella* and Shigellosis.

The goal of the work was to investigate the ultrastructure of isolates of *Campylobacter* isolated from poultry products.

Materials and methods of research. The isolated isolates were cultured on a dense blood medium (Columbia agar with 10% defibrillated sheep's blood). Cultivated at 37 ° C and 7% CO₂ for 48-72 h.

The isolated isolates were removed from culture media and emulsified in a phosphate buffer saline solution. Then the material was prepared according to the methods for electron microscopic examination.

Results of research and discussion. The choice of the method of preparation of material for the purpose of manufacturing from it preparations for electron microscopic examination depends on the concentration of the microorganism in the suspension, the degree of its contamination by foreign ballast substances and morphology of the pathogen. The basis for using direct electron microscopy of the materials studied was taken.

Conclusions and prospects for further research. An electron microscopy carried out a morphological study of the ultrastructure of the isolates of *Campylobacter* isolated from poultry products.

The mechanism of coccal cell formation remains unknown, but our observation suggests a progressive change in the microorganism associated with degeneration of the cell wall and a change in the conditions of cultivation, which allows further research in this direction.

Key words: campylobacter, pathogen, distribution, intestinal infection, electron microscopy.

REFERENCES

1. Rautelin, H., and M. L. Hanninen (2000) Campylobacters: the most common bacterial enteropathogens in the Nordic countries. *Ann. Med.*, 32, 440–445 [in English].
2. European Food Safety Authority—EFSA (2015) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.*, 13, 3991–4153 [in English].
3. Center for Disease Control and Prevention—CDC. (2014) In: Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food. *Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S.*, 63., 328–332 [in English].
4. Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI & Swerdlow DL. (1999) Campylobacter jejuni an emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis.*, 5, 28–35 [in English].
5. Kuwabara S. (2011) Does Campylobacter jejuni infection elicit axonal or demyelinating Guillaine Barré syndrome, or both. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 82., 238 [in English].
6. Uikli B. (1972) *Jelektronnaja mikroskopija dlja nachinajushhih [Electron microscopy for beginners]*. M.: Myr [in Russian].
7. Smibert, R. M. (1978) The genus *Campylobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 32, 674-709 [in English].