

СУЧАСНІ АСПЕКТИ ДІАГНОСТИКИ КАМПІЛОБАКТЕРІОЗІВ

Бабкін А.Ф., Калініченко Т.В.

ННЦ «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Кишкові кампілобактеріози набувають все більшого значення як зооантропонози, що проявляються масовими гастроентеритами людей і тварин. Сільськогосподарські й свійські тварини, птахи є резервуаром кишкових кампілобактерій. Харчові продукти тваринного походження мають важливе значення у механізмі розповсюдження збудника хвороби. В статті описані напрямки досліджень з застосуванням сучасних методів діагностики та ідентифікації збудників кишкових кампілобактеріозів.

Кампілобактеріози – небезпечні інфекційні хвороби тварин, птахів та людей, викликані грам-негативними бактеріями з роду *Campylobacter*. Кампілобактерії спричиняють запалення травної та сечо-статевої систем організму. Взаємозв'язок між епізоотичним та епідемічним процесами кампілобактеріозної інфекції свідчить про актуальність цього небезпечного зооантропонозу. Згідно з даними Moore J.E. та ін., від 5 до 14 % бактеріальних гастроентеритів у людей спричиняють *C. jejuni* та *C. coli*, ці збудники циркулюють серед великої та дрібної рогатої худоби, свиней і птахів; *C. upsaliensis* – серед котів і собак; *C. lari* – серед морських птахів, та *C. fetus* – серед ВРХ і ДРХ [18]. Загальна схема передачі та циркуляції кампілобактерій – збудників харчових токсикоінфекцій людини – представлена на рис.1. Джерелом збудника хвороби досить часто є контаміновані харчові продукти, забруднена питна вода або м'ясо та субпродукти хворої свійської птиці та тварин [10, 11, 21]. Велику роль у поширенні кампілобактеріозної інфекції відіграють дикі та синантропні птахи [4]. Роль хворих людей і носіїв збудника у поширенні кампілобактеріозу серед тварин вивчено недостатньо. Провідний шлях передачі – харчовий. Основними причинами захворювання на кампілобактеріоз людей вважають споживання недостатньо термічно обробленого м'яса птиці, сирого молока і контамінованої питної води. Природна сприйнятливість людей досить висока, особливо у дітей віком до 2 років. Вважають, що для розвитку захворювання при пероральному зараженні достатньо менш ніж 500 мікроорганізмів [10], за іншими даними ще менша кількість – 108 клітин [11].

Важливою проблемою ветеринарної санітарії слід вважати контроль забруднення харчових продуктів тваринного походження кампілобактеріями. У звіті доктора Tim O'Brien (1997) вказується на те, що 48 % бройлерів на ринку Великобританії було контаміновано кампілобактеріями, у 11 з 12-х досліджених індичок у процесі обробки та перед продажем також було виявлено кампілобактерії. У Північній Ірландії кампілобактеріоз був виявлений у 94 % тушок свіжих курчат. В Голландії виявлено інфікованість 85 % дослідженого поголів'я свиней [16].

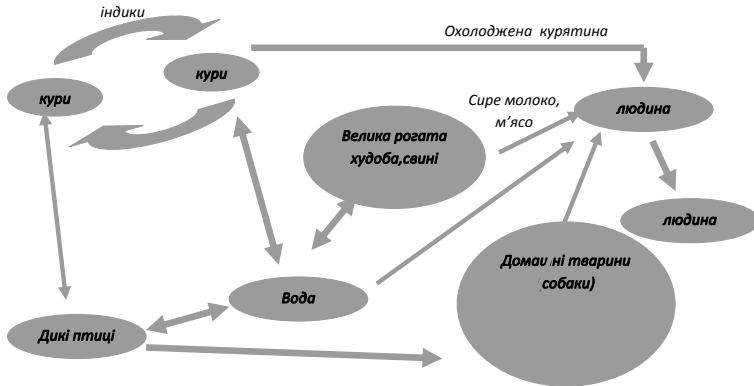


Рис.1. Загальна схема передачі і циркуляції *C. jejuni* (за Robert V. Tauxe)

В Україні кампілобактерії вперше були виявлені в 1938 році Є.В.Козловським. В 1959 році неблагополучними по вібриозу великої рогатої худоби, збудником якого є *C. fetus*, були 12 областей. Ступінь неблагополуччя в них значною мірою різнилася [3]. Проблеми вібриозу сільськогосподарських тварин присвячено значну кількість робіт [5]. Поширення інших видів кампілобактерій у ветеринарній медицині, зокрема *C. jejuni*, *C.coli*, *C.upsaliensis*, *C.lari*, майже не вивчалось. Були зроблені спроби з'ясувати поширення кампілобактерій у птахогосподарствах країни. Дослідженнями Сахацької О.І. (2001—2004рр) встановлено неблагополуччя на кампілобактеріоз 41 % досліджених птахогосподарств Сумської, Чернігівської та Київської областей. Встановлено, що ураженість тушок птиці в місцях їх реалізації в Сумській області коливалася від 3,4 % до 23,0 %. Результати досліджень свідчать, що 69,7 % ізолятів було ідентифіковано як *C. jejuni*, 18,8 % як *C.fetus* і 11,5 % як *C.coli*. Показник захворюваності людей на гастроентерити, спричинені кампілобактерами, в даному регіоні на час досліджень становив від 10,70 % до 16,59 % [7].

Бактеріоскопічний метод дослідження мазків, забарвлених фуксином Циля або люмінесцентними барвниками, дозволяє проводити індикацію кампілобактерій за наявності в 1см³ досліджуваного матеріалу 10⁵-10⁶ та 10⁴-10⁵ мікробних тіл, відповідно, але він не дає можливості встановити вид збудника.

Для культивування кампілобактерій використовують поживні середовища. Обов'язковою умовою є виділення чистих культур кампілобактерій із досліджуваного матеріалу [4, 13, 14]. З цією метою використовують фільтрацію матеріалу, оснований на здатності цих збудників проходити через фільтри з діаметром пор 0,65 або 0,45 мкм. Також використовують спеціальні селективні поживні середовища з антибіотиками (цефалоспори́ни, триметоприм, поліміксини, новобіоцин, ванкоміцин, тейклопланін, бацитрацин, рифампіцин, натрій деоксихолат та ін.), до яких кампіло-

бактери не чутливі [20, 21]. Недоліком останньої методики слід вважати те, що не завжди вдається виділити чисту культуру кампілобактерій.

Культуральний метод, дає позитивні результати за наявності в 1см³ матеріалу від 20 до 100 мікробних клітин збудника кампілобактеріозу. Більшість кампілобактерій добре ростуть в мікроаерофільній атмосфері, що містить 5 % кисню, 10 % вуглекислого газу, 85 % азоту, при температурі 37,5°C на напіврідких та твердих поживних середовищах. Культивують бактерії впродовж 6-10 діб, облік результатів посіву проводять кожні 3 дні [11]. Поодинокі колонії з'являються через 48 годин, далі проводять обов'язкову типізацію за допомогою фенотипічних тестів. При дослідженні зразків, де концентрація кампілобактерій невисока, виявити кампілобактерії вдається лише через 5 діб. Слід враховувати що при культивуванні на селективних середовищах можливе відсіювання менш розповсюджених видів кампілобактерій, таких як *S. upsaliensis* і *S. lari*, тому можлива постановка помилково негативних результатів та недооцінка істинної тяжкості інфекції з цими видами [20].

За повідомленнями Rollins D.M. (1986), Юдіна І.П. (2007) для *S. jejuni* при дії таких факторів зовнішнього середовища, як зниження температури або рН, в умовах осмотичного стресу, аерації, відмічають перехід бактерій в стан, що отримав назву *viable but nonculturable* (живий але некультуральний) – стан бактеріальної клітини, яка проявляє метаболічну активність, але не здатна піддаватися безперервному клітинному діленню, що потрібно для визначення росту в поживному середовищі [12, 25]. Для лабораторної практики важливим є те, що відмова від росту відбувається при роботі стандартизованими методами. Тобто існує небезпека недооцінки кількості життєздатних мікроорганізмів і отримання помилково негативних результатів.

Ідентифікацію *Campylobacter* spp. проводять на підставі класичних фенотипових особливостей збудника, зокрема морфологію колоній, рухливись, проби на каталазу та оксидазу, індоксилатетатний гідроліз, продукування H_2S , і чутливість до антибіотиків (зокрема бензохінонів) [20]. Біохімічні особливості кампілобактерій приведено в таблиці 1.

Недоліком цього класичного фенотипічного підходу є те, що поділ на види часто базується на одній або двох відмінних ознаках, таких як присутність гіппуриказної та уреазної активності. Зокрема, тест на гіппуриказу диференціює більшість штамів *S. jejuni* від інших кампілобактерій. Однак, приблизно 5-8 % *S. jejuni* не проявляє гіппуриказної активності, що веде до помилково негативних результатів. Крім того, в багатьох країнах відмічають збільшення стійкості *S. jejuni* і *S. coli* до бензохінонів (Engberg та ін., 2001; Engberg та ін., 2005) [17, 18]. Недоліки виявляються і при використанні деяких ідентифікаційних тестів, що базуються на біохімічних властивостях кампілобактерій. Так при використанні біохімічного тесту API Campy (API Біомієрикс Ltd., Marcy l'Etoile, Франція) *S. concisus* помилково диференціюється як *S. mucosalis*, а *A. butzleri* як *A. sputaerophilus* або *N. cinaedi*. Є повідомлення про деякі труднощі в ідентифікації деяких штамів *S. coli* і *S. lari* [20]. Тобто ідентифікація культур кампілобактерій потребує використання додаткових методів, таких як серологічні та генетичні дослідження.

Таблиця 1 — Ідентифікація кампілобактерій за біохімічними властивостями

Вид кампілобак-терій	Катаळाза	H_2S		Ріст на НРА					Антигенні властивості РА з сироваткою				Патогенні для	
		НРА	НРА з 0,02% цистеїну	t 25°C	t 42°C	1% Гліцину	10% жовчі	3,5% $NaCl$	<i>C.f.s. venerealis</i>	<i>C.f.s. fetus</i>	<i>C. bubus</i>	<i>C. jejuni</i>		
<i>C.f.s. venerealis</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	ВРХ
<i>C.f.s. fetus</i>	+	+/-	++	++/-	+	++	--	++	++	++	++	++	++	ВРХ, ВІДЦІ, СВИНІ
<i>C. jejuni</i>	+	-	--	++	+	++	--	++	++	-	-	++	++	ВРХ, ВІДЦІ, ПТИЦЯ
<i>C.s.s. sputorium</i>	-	+	--	++	+	--	++	--	--	+	-	--	--	Не пато-генний

Розвиток полі- та моноклональних антитіл, для визначення видів кампілобактерій, полегшило розвиток багатьох тестів на основі антитіл. Латексні тести аглютинації, що спрямовані на ідентифікацію кампілобактерій, можуть забезпечити більш надійне і швидке визначення виду, ніж звичайні фенотипічні тести. Серологічну діагностику проводять шляхом постановки РА, РЗК (РДЗК) і методом флуоресцентних антитіл. У великої рогатої худоби реакцію аглютинації зазвичай ставлять з вагінальним слизом (РАВС), при цьому достовірність результатів значною мірою залежить від стану статевих органів досліджуваних тварин [11, 15]. Скулін І.М., Галіщев М.І. повідомляють про зміну як біохімічних властивостей, так і антигенної структури *S.fetus subsp. venerealis* в бік *S.fetus subsp. interstinalis* при довготривалому зберіганні на напіввідкомому агарі [8]. Вони ж повідомляють про серологічну неоднорідність *S.jejuni* [9], що дещо ускладнює діагностику.

У літературі описано застосування ELISA для виявлення специфічних IgA та IgG в сироватці крові та вагінальному слизі хворих тварин [15]. Комерційний тест для ELISA (ProSpecT Microplate assay; Alexon-Trend, США) використовується для виявлення *S. jejuni* і *S. coli* безпосередньо у фекальних зразках від хворих гастроентеритом. В дослідженнях цей тест показав високу чутливість (96 %) при специфічності 99 % [20]. При цьому результати були отримані протягом кількох годин, а не днів, що може бути корисним для постановки раннього точного діагнозу.

Найточнішими методами ідентифікації мікроорганізмів являються генетичні, зокрема ПЛР [23]. Однак застосування методу ПЛР потребує наявності дорогої апаратури і реагентів, що саме по собі не сприяє його широкому впровадженню в практику вітчизняних діагностичних лабораторій.

Адаптація ПЛР аналізу до формату гібридизації на пластинці, або ПЛР- ELISA збільшила специфіку і чутливість виявлення. Lawson та ін. розробили планшет для ПЛР-ELISA, який був використаний при крупномаштабному дослідженні кампілобактерій – збудників гастроентеритів людини. Цим методом виявляють і диференціюють *S.jejuni*, *S.coli*, *S.upsaliensis*, *S.helveticus*, *S.fetus*, *S.hyointestinalis* і *S.lari*. Крім того тест дозволяв виявити некультурабельні форми кампілобактерій та встановити змішані форми інфекції з більш ніж одним видом кампілобактерій. Все ж автори відмічали трудоемкість та дороговизну методики [22].

Перше повідомлення про використання ПЛР для виявлення кампілобактерій в харчових продуктах було зроблено Giesendorf та ін. (1992), які описали дослідження в ПЛР продуктів птахівництва. Кампілобактерій виявляли і в природно забруднених, і в штучно контамінованих зразках шкіри після збагачення зразків на поживному середовищі протягом 18 годин. Цим методом виявляють 25 мікробних тіл в 1 грамі досліджуваних зразків [19]. Але на думку деяких авторів, чутливість даної методики має бути вищою і становити 1 клітину в 25 грамівій пробі [21]. Кількісне виявлення кампілобактерій в сирому м'ясі є процесом досить складним, зокрема через наявність інгібіторів ПЛР – гепарину і гемоглобіну. Більш того, звичайні методи ПЛР виявляють лише хромосом-

ні генні послідовності, які можуть бути присутніми в нежиттєздатних клітинах. Пряме виявлення генів збудника у ПЛР не може визначити життєздатність виявлених клітин. Були проведені дослідження для *S. jejuni* з виявлення життєздатних клітин, з використанням матричної РНК як мішені для ПЛР із зворотною транскрипцією [26]. При цьому було виявлено, що на ступінь деградації РНК в клітинах значною мірою впливали час та інтенсивність обробки зразків. Відмітимо, що використання чутливих, кількісних методів ПЛР для виявлення кампілобактерій під час обробки харчових продуктів можуть бути використані для виявлення місць, в яких відбувається забруднення інфекційним агентом, та для введення міроприємств по попередженню обмінення харчових продуктів, таким чином зменшуючи ризик зараження людей.

Висновки. Проблема лабораторної діагностики кампілобактеріозів є актуальною у ветеринарній та гуманній медицині. Проведено огляд 25 літературних джерел щодо ефективності застосування різних сучасних методів у лабораторній діагностиці кампілобактеріозів тварин і людей.

Список літератури

1. Бабкин, А.Ф., Галишев, Н.И., Новаковский, Д.С. Изучение выживаемости кампилобактерий, хранящихся в лиофильном состоянии на питательных средах // Вет. медицина: міжвід. тематич. наук. зб. — X., 2002. — Вип. 80. — С. 42-47. 2. Бабкин, А.Ф., Галишев, Н.И., Новаковский, Д.С. Культурально-биохимические свойства кампилобактеров и получение моноспецифических сывороток // Вет. медицина: міжвід. тематич. наук. зб. — X., 2003. — Вип. 81. — С. 25-33. 3. Жованик, П.М., Алфімова, Г.В., Скулін, І.М. Результаты вивчення вібриозу великої рогатої худоби в господарствах України // Ветеринарія, випуск 16. — К., Урожай, 1968. — С. 95-103. 4. Кирьянов, Е.В. Кампилобактериоз животных: Лекция/ Приморский с.-х. ин-т. — Уссурийск, 1992. — 23 с. 5. Новаковский, Д.С. Кампилобактериоз: вивчення проблеми : Літературний огляд // Вет. медицина: міжвід. тематич. наук. зб. — X., 2004. — Вип. 84. — С. 531-536. 6. Новаковский, Д.С. Применение ОН-антигена *Campylobacter fetus* ssp. *fetus* 6913 I сероварианта для получения диагностической сыворотки для выявления *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* и *Campylobacter fetus* ssp. *fetus* I сероварианта // Вет. медицина: міжвід. тематич. наук. зб. — X., 2003. — Вип. 82. — С. 430-433. 7. Сахачька, О.І. Удосконалення методів діагностики та профілактики кампілобактеріозу птиці // Автореф. дис. канд. вет. наук; УААН. Ін-т експерим. і клініч. вет. медицини. — X., 2005. — 20 с. 8. Скулін, І.М., Галишев, М.І. Вивчення мінливості у штамів вібро фетус при зберіганні на напіврізкому агарі // Ветеринарія, випуск 51. — К., Урожай, 1980. — С. 10-12. 9. Скулін, І.М., Галишев, М.І. Серологічна ідентифікація кампілобактерій ізольованих від ВРХ // Ветеринарія, випуск 54. — К., Урожай, 1981. — с. 12-14. 10. Слободкин, В.І., Шелкова Н.Г., Левичька В.М. Деякі особливості розвитку епідемічного процесу за сучасних умов виробництва харчових продуктів // Проблеми харчування. — 2006. — №3. 11. Шумилов, К. В., Скляров, О. Д., Каравайчик, А. Л., Велик, В.В. Кампилобактериоз собак // Ветеринарія, 10. — 2001. — С. 46-51. 12. Юдин, И.П. Современные подходы к оценке жизнеспособности бактерий с акцентом на феномене некультурабельности. // Annals of Mechnicov Institute — № 3. — 2007. — С. 8-16. 13. Atabay, H.I., Corry, J.E.L. The isolation and prevalence of campylobacters from dairy cattle using a variety of methods // Journal of Applied Microbiology. — 1998. — Vol. 84. — P. 733-740. 14. Bolton, F.J., Coates, D., Hinchliffe, P.M., Robertson, L. Comparison of selective media for isolation of *Campylobacter jejuni/coli* // J. Clin. Pathol. — 1983. — Vol. 36. — P. 78-83. 15. Bovine Genital *Campylobacteriosis* // OIE Terrestrial Manual. — 2008. — P. 661-670. 16. Dr Tim O'Brien. Factory Farming and Human Health // Hants, Compassion in World Farming Trust. — 1997. — P. 8-9. 17. Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smidt P, Nachamkin I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates // Emerg Infect Dis. — 2001. — Vol. 7. — P. 24-34. 18. Engberg J, Keelan M, Gerner-Smidt P, Taylor DE. Antimicrobial resistance in *Campylobacter*. In Aarestrup FM, editor, Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Veterinary and public health aspects. Washington D.C.: ASM Press, in prep. 2005. 19. Giesendorf B.A., Quint W.G., Henkens M.H., Stegeman H., Huf F.A., Niesters H.G., Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction // Appl. Environ.

Microbiol. – 1992. – Vol.58. – P.3804–3808. **20.** John E. Moore et all. Campylobacter// Vet. Res. – 2005. – Vol.36. – P.351–382. **21.** Jorgen Engberg. Contributions to the epidemiology of Campylobacter infections// Danish Medical Bulletin - No. 4. November, 2006. – Vol. 53. – P. 361–389. **22.** Lawson A.J., On S.L., Logan J.M., Stanley J. Campylobacter hominis sp. nov., from the human gastrointestinal tract// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – Vol.51. – P.651–660. **23.** Oyofo B.A., Thornton S.A., Burr D.H., Trust T.J., Pavlovskis O.R., Guerry P. Specific detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli by using polymerase chain reaction// J. Clin. Microbiol. – 1992. – Vol.30. – P.2613–2619. **24.** Robert V. Tauxe. Incidence, trends and sources of Campylobacteriosis in developed countries: An overview// The Increasing Incidence of Human Campylobacteriosis. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts – 2000. – P.42–43. **25.** Rollins D.M., Colwell R.R. Viable but nonculturable stage of Campylobacter jejuni and its role in survival in the natural aquatic environment.// Appl. Environ.Microbiol. – 1986. – Vol.52. – P.531.

MODERN METHODS OF CAMPYLOBACTERIOSIS DIAGNOSTIC

Babkin A.F., Kalinichenko T.V.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

Intestinal campylobacteriosis get the increasing value as zoonoepidemiology which are shown human and animal gastroenteritis. Industrial animals, pets and birds are the tank of intestinal campylobacter. Foodstuff of an animal origin is one of factors in the mechanism of distribution of an infecting agent. In article the directions of researches on application of modern diagnostics and identification methods of activators intestinal campylobacteriosis has described.

УДК 619:616.98:616.682-002

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ТА ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНОГО ЕПІДИДИМІТУ БАРАНІВ

Бабкін А.Ф., Райко Д. Ю.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

У статті представлено причини стаціонарного неблагополуччя і напрямки оздоровлення вівцепоголів'я від Brucella ovis інфекції.

Інфекційний епідидиміт баранів (*Brucella ovis* infection) – хронічна інфекційна хвороба овець, що супроводжується різного ступеня проліферативним запаленням і атрофією сім'яників та придатків у баранів, частковою або повною втратою їх репродуктивної функції, а у вівцематок спостерігаються випадки абортів, народження мертвого, нежиттєздатного приплоду та безпліддя. Наслідками хвороби є великі економічні збитки за рахунок зниження відтворювальної функції баранів та вівцематок, вибуття зі стада цінних у племінному відношенні тварин. Проведення ветеринарно-санітарних і господарських заходів щодо ліквідації хвороби також вимагають додаткових витрат. Під час гострого перебігу хвороби спостерігається загальне пригнічення, зниження або відсутність апетиту, підвищення температури тіла до 41–42°C, ексудативне запален-