

ВЫЯВЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ *CAMPYLOBACTER* SPP. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Г. С. Скитович¹, К. В. Серова², Н. Б. Шадрова³, О. В. Прунтова⁴

¹ Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: skitovich@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-0714-3912

² Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: serova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1747-2528

³ Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: shadrova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-7510-1269

⁴ Главный эксперт, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: pruntova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-3143-7339

РЕЗЮМЕ

Бактерии рода *Campylobacter* — одни из основных зоонозных патогенов, вызывающих заболевания человека и животных. Кампилобактерии являются микроаэрофилами, поэтому для роста им требуется низкая концентрация кислорода (3–5%) и высокая концентрация диоксида углерода (3–10%). В качестве источника энергии они используют не углеводы, а аминокислоты. Классические бактериологические методы выявления бактерий рода *Campylobacter* не всегда являются успешными из-за сложности обеспечения оптимальных условий для их роста. В связи с этим разработка и внедрение в практику молекулярных методов обнаружения и идентификации *Campylobacter* является актуальной задачей. Была оптимизирована методика качественного обнаружения генома бактерий *Campylobacter* spp. посредством полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием термоциклера CFX-96. Мишенью амплификации был выбран высокоспецифичный участок гена 16S рРНК, позволяющий определить шесть видов кампилобактерий: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus* и *C. hyointestinalis*. Подобрана оптимальная концентрация ионов магния (2,5 мМ) и температура отжига праймеров (58 °С). Было протестировано 18 референтных штаммов различных бактерий. Положительный результат был показан только со штаммами, относящимися к роду *Campylobacter*. Чувствительность метода составила 40 молекул-мишеней. С использованием данной методики исследовали 76 проб сырья животного происхождения. Геном *Campylobacter* spp. был обнаружен в 18 образцах. Полученные результаты показывают, что оптимизированный вариант полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, основанный на амплификации гена 16S рРНК, представляет собой специфичный, чувствительный, быстрый, воспроизводимый и точный метод для качественного обнаружения *Campylobacter* spp. в пробах сырья животного происхождения.

Ключевые слова: *Campylobacter* spp., полимеразная цепная реакция в реальном времени, сырье животного происхождения.

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии рода *Campylobacter* являются возбудителями инфекционных болезней, проявляющихся у млекопитающих абортными, временным бесплодием, задержанием последа, вагинитами, метритами, рождением нежизнеспособного молодняка, а у кур — снижением прироста массы бройлеров, яйценоскости кур-несушек и падежом цыплят. Кроме того, эти бактерии являются одной из основных причин гастроэнтерита у людей [9, 15, 19].

По состоянию на 2014 г. род *Campylobacter* включал 26 видов и 9 подвидов [12]. Примерно половина из них — известные патогены млекопитающих, хотя заболевание человека в основном связано с *C. jejuni* и *C. coli*. Имеются данные, свидетельствующие о том, что другие *Campylobacter* spp., такие как *C. concisus*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, *C. fetus*, *C. curvas* и *C. lari*, могут также вызывать заболевания у людей [8, 21]. Заболеваемость кампилобактериозом постепенно увеличивается, и *Campylobacter* в настоящее время считается ведущей причиной бактериального гастроэнтерита во всем мире [5, 14, 25]. Считается, что около 90% диарейных заболеваний вызваны *Campylobacter* spp. [23]. Ежегодно в странах Европейского союза отмечается 9,2 млн случаев кампилобактериоза [10] и 1 млн случаев — в США [13]. В 2015 г. в Австралии было зарегистрировано 22 564 случая инфекций, вызванных бактериями рода *Campylobacter* [26].

Методы лабораторной диагностики кампилобактериоза и производственного бактериологического контроля продуктов животноводства основаны на выделении чистой культуры возбудителя из биологического материала животных посредством посевов на кровяной или эритроцитный агар с железом-сульфитом-пируватными добавками. Все этапы инкубации посевов *Campylobacter* spp. осуществляются в микроаэрофильных условиях. Для видовой дифференцировки кампилобактеры культивируют при различных температурных режимах [1, 2].

Рутинное выявление кампилобактерий микробиологическим методом с использованием селективного обогащения для уменьшения роста фоновой микрофлоры с последующей биохимической идентификацией в первую очередь направлены на обнаружение *C. jejuni* и *C. coli*. Другие патогенные представители *Campylobacter* spp. имеют дополнительные требования к условиям культивирования. Например, *C. concisus* является медленно растущим организмом, который требует наличия обогащенной водородом атмосферы. Если оптимальные условия роста не соблюдаются, то выделить искомым микроорганизм на питательной среде невозможно [16]. Недостаточная чувствительность методов культивирования, медленная скорость

роста бактерий и ошибочная идентификация стандартными фенотипическими методами могут привести к ложноотрицательным результатам. Следовательно, существует потребность в альтернативных ускоренных, чувствительных методах обнаружения *Campylobacter*, к числу которых относится полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) [18, 20, 22].

Ускоренные методы позволяют существенно сократить (на 24–48 ч) продолжительность исследований. Обладая высокой специфичностью, они обеспечивают надежное выявление *Campylobacter* в анализируемом материале [11, 27].

Целью работы была оптимизация методики выявления генома *Campylobacter* spp. посредством ПЦР-РВ в образцах продуктов животного происхождения и биологическом материале от животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ДНК. Бактериальную ДНК выделяли с помощью набора «Сорб-ГМО-А» (ООО «Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Олигонуклеотиды. Праймеры и зонды, кодирующие последовательность гена 16S рНК для идентификации кампилобактерий, используемые в данной работе и описанные ранее М. Lund и соавт. [8], были синтезированы ООО «Синтол» (Россия). Первичные структуры олигонуклеотидов представлены в таблице 1.

Условия проведения ПЦР-РВ. Для постановки ПЦР использовали «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ» производства ООО «Синтол» (Россия). Реакционную смесь собирали из следующих компонентов в расчете на одну пробу объемом 25 мкл: 5 мкл ДНК; 10× ПЦР-буфера; 2,5 мкл 2,5 мМ dNTP; 2,5 мкл 25 мМ MgCl₂; по 0,3 пкМ прямого и обратного праймеров; 0,15 пкМ зонда; 2,5 Е Syntaq ДНК-полимеразы.

В качестве положительного контроля использовали ДНК, выделенную из суспензии референтного штамма *C. jejuni* ATCC 29428 с оптической плотностью 0,5 ед. по стандарту МакФарланда, что соответствует 1×10^8 КОЕ/см³. Суспензию готовили с применением 0,9%-го раствора NaCl. В качестве отрицательного контроля использовали бидистиллированную воду.

Амплификацию в режиме реального времени проводили на термоциклере CFX-96 (Bio-Rad, США) при условиях: прогрев смеси при 50 °С 2 мин; активация фермента при 95 °С 10 мин; 45 циклов – 95 °С 15 с, 58 °С 1 мин. Результаты интерпретировали по наличию или отсутствию значения порогового цикла Ct. Пробу считали положительной при Ct ≤ 40.

Определение аналитической чувствительности тест-системы ПЦР-РВ проводили, используя серии 10-кратных разведений бактериальной ДНК, выделенной из суспензии референтного штамма *C. jejuni*

ATCC 33291 с оптической плотностью 1 ед. по стандарту МакФарланда, что соответствует 3×10^8 КОЕ/см³. Суспензию готовили с использованием 0,9%-го раствора NaCl. Концентрацию микроорганизмов подтверждали методом титрования на плотной питательной среде – колумбийском агаре (HiMedia, Индия) с добавлением 5% дефибринированной крови барана. Концентрацию выделенной ДНК определяли с использованием спектрофотометра Implen NanoPhotometer P-Class P-360 (Implen, Германия). Разведения ДНК готовили с использованием буфера TE в объеме 100 мкл.

Образцы. В работе использовали 76 образцов сырья животного происхождения, поступивших на исследование в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2017–2018 гг. Образцы представляли следующие группы: птица – 13 проб; полуфабрикаты куриные – 25 проб; молоко коровье сырое – 33 пробы; кровь птицы – 4 пробы; смыв с подстилки – 1 проба.

Подготовка образцов к исследованию. Навеску продукта массой 10 г или объемом 10 см³, подготовленную для исследования, вносили в 90 см³ среды для первичного обогащения *Campylobacter* (питательный бульон Болтона производства ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Посевы инкубировали в анаэробных условиях при температуре 37 °С в течение 4–6 ч, затем при температуре 41,5 °С в течение (44 ± 4) ч. После этапа первичного обогащения содержимое посевов перемешивали и из средней части отбирали по 250 мкл суспензии в полипропиленовые пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и затем исследовали в ПЦР-РВ.

Для оценки специфичности праймеров использовали референтные штаммы, полученные из Американской коллекции типовых культур (ATCC): *Campylobacter jejuni* ATCC 33291; *Campylobacter coli* ATCC 43478; *Campylobacter lary* ATCC 35221; *Listeria monocytogenes* ATCC 19115; *Listeria innocua* ATCC 33090; *Listeria ivanovii* ATCC 19119; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Bacillus cereus* ATCC 11778; *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; *Rodococcus equi* ATCC 6939; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P; *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Shigella flexneri* ATCC 12022; *Shigella sonnei* ATCC 11060; *Proteus mirabilis* ATCC 29906; *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610.

Для роста референтных нецелевых штаммов использовали колумбийский агар (HiMedia, Индия) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 ч. Референтные штаммы *Campylobacter* выращивали на колумбийском агаре (HiMedia, Индия) с добавлением 5% дефибринированной крови барана и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч в микроаэробных условиях (CO₂ – 10%, O₂ – 5%, N₂ – 85%) согласно МУК 4.2.2321-08. Для достижения данных условий использовали газогенерирующие пакеты «Кампилогаз» («ИНКО», Россия).

Для исследования в ПЦР-РВ готовили суспензии референтных штаммов с плотностью 0,5 ед. по стандарту МакФарланда. Плотность измеряли с использованием денситометра (BioMerieux, Франция), а также подтверждали количеством жизнеспособных бактерий методом 10-кратных разведений культур на чашках с колумбийским агаром, с добавлением для кампилобактерий 5% дефибринированной крови барана (HiMedia, Индия).

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки полученных результатов и постро-

Таблица 1
Нуклеотидные последовательности праймеров и зонда для обнаружения участка генома *Campylobacter* spp.

Наименование		Последовательность (5'–3')
camp2	Forward:	CACGTGCTACAATGGCATAT
	Reverse:	GGCTTCATGCTCTCGAGTT
	Probe:	FAM-CAGAGAACAATCCGAAGTGGGACA-RTQ1

ения кривой линейной регрессии провели три повторных эксперимента с 10-кратными разведениями геномной ДНК. Эффективность амплификации рассчитали по формуле: $E = (10^{\text{slope}} - 1) \times 100\%$, где 10^{slope} – коэффициент наклона. Результаты ПЦР-РВ анализировали с помощью программного обеспечения системы v3.1 (CFX Manager Software).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам анализа литературных данных были выбраны последовательности, кодирующие участок гена 16S рРНК (табл. 1) [8]. Указанные праймеры идентифицируют четыре вида термофильных кампилобактерий: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, которые в основном встречаются в организме домашней птицы и являются патогенными для человека [4, 17]. Кроме того, с помощью данных праймеров идентифицируют *C. helveticus* и *C. hyointestinalis*, первую из которых обнаруживают в основном у кошек и собак [6], вторая распространена среди свиней [7].

Оптимизация ПЦР-РВ для обнаружения бактерий *Campylobacter* spp. включала определение точной температуры отжига праймеров и концентрации ионов магния, при которых отмечали наивысшую интенсивность ответного флуоресцентного сигнала при высокой специфичности. Оптимальная температура отжига определяется структурой праймеров [3]. В результате проведенных расчетов по формуле: $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$, где T_m – температура отжига; А, Т, С, G – нуклеотидные основания, температура отжига для прямого и обратного праймеров составила 58 °С, температура отжига зонда – 72 °С. Для определения оптимальной температуры проводили реакции ПЦР-РВ в градиенте ± 10 °С от вычисленной температуры отжига праймеров. Наилучшие результаты были получены для температуры 58 °С.

При определении концентрации ионов магния использовали ПЦР-смеси с концентрациями от 2 до 6 мМ с шагом 0,5 мМ. В результате проведенных исследований была выбрана концентрация 2,5 мМ.

Оптимальные условия, которые показывают наименьшее значение порогового цикла (C_t) с наименьшими концентрациями праймеров и зонда, указаны в материалах и методах.

Аналитическая чувствительность. Для оценки аналитической чувствительности метода использовали ДНК, выделенную из суспензии контрольного штамма *C. jejuni* ATCC 33291 с оптической плотностью 1 ед. по стандарту МакФарланда, что соответствует 3×10^8 КОЕ/см³. Концентрация ДНК была измерена с помощью нанофотометра IMPLENP-classP-360 (Германия) и составила 12,4 нг/мкл.

В соответствии со средним размером генома различных исследуемых микроорганизмов 1 нг геномной ДНК соответствует как минимум 3×10^5 клеткам [24]. Таким образом, концентрация ДНК 12,4 нг/мкл соответствует приблизительно 4×10^6 бактериальным клеткам в 1 мкл. Выделенную ДНК разводили буфером ТЕ с шагом 10 и проводили реакцию амплификации в трех повторностях со следующими количествами бактериальных клеток в образцах: 4×10^5 ; 4×10^4 ; 4×10^3 ; 4×10^2 ; 40; 4; 0,4 (рис. 1).

Для каждого разведения (3 повторности) рассчитывали среднее значение C_t и стандартное отклонение ($\pm SD$) (табл. 2).

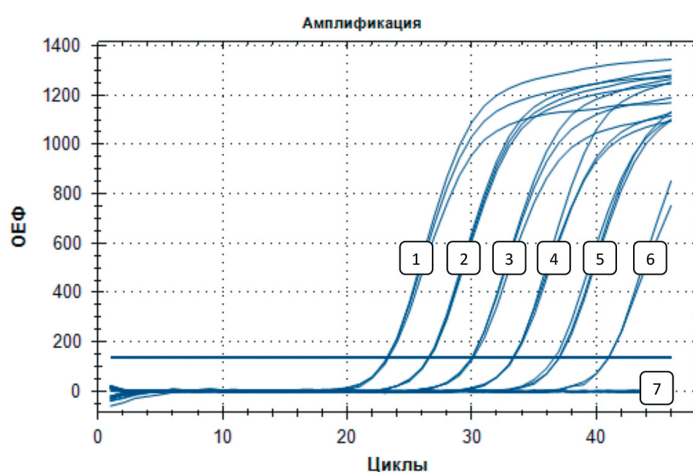


Рис. 1. График накопления флуоресцентного сигнала при выявлении генома *Campylobacter* spp. в ПЦР-РВ ($n = 3$)

Концентрация бактериальных клеток:

1 – 4×10^5 ; 2 – 4×10^4 ; 3 – 4×10^3 ; 4 – 4×10^2 ; 5 – 40; 6 – 4; 7 – 0,4.

Полученные результаты показали, что участок гена 16S рРНК был амплифицирован в первых пяти разведениях вплоть до 4 копий генома *Campylobacter*.

Для оценки эффективности методики провели три повторных эксперимента и получили значения C_t , которые использовали для построения регрессионной кривой (рис. 2). Было показано, что количества ДНК-мишени линейно коррелировали со значениями C_t при коэффициенте корреляции, равном 0,9986. Используя значение угла наклона, полученного при построении кривой линейной регрессии, вычислили значение эффективности амплификации $E = 92,26\%$.

Регрессионный анализ подтверждает линейность полученных результатов. Эффективность амплификации ($E = 92,26\%$) и коэффициент корреляции ($R^2 = 0,9986$) показывают, что оптимизированная методика обеспечивает высокоточное определение *Campylobacter* spp.

Определение специфичности. Чтобы оценить специфичность анализа ПЦР-РВ, проверили на перекрестную реактивность ДНК, выделенную из 18 видов бактерий, в том числе трех целевых (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) и 15 нецелевых штаммов (рис. 3).

Значения флуоресценции красителя FAM позволили однозначно идентифицировать все штаммы, принадлежащие к роду *Campylobacter*, тогда как флуоресценции для нецелевых штаммов не наблюдалось. Эти результаты доказывают, что оптимизированная методика является высокоспецифичной. Для успешного применения методики крайне важно, чтобы специфичная для видов *Campylobacter* реакция была одинаково эффективной. Анализ профилей флуоресценции, полученных при исследовании специфичности, показал, что значения C_t были близкими по значению и не зависели от конкретных видов *Campylobacter* (средние значения $C_t 21,39 \pm 0,74$) (рис. 3).

Таким образом, предложенная методика проведения ПЦР-РВ позволяет специфично определять целевые штаммы рода *Campylobacter*.

Выявление генома бактерий *Campylobacter* spp. в сырье животного происхождения. С использованием оптимизированной методики ПЦР-РВ исследовали 76 проб сырья животного происхождения (табл. 3).

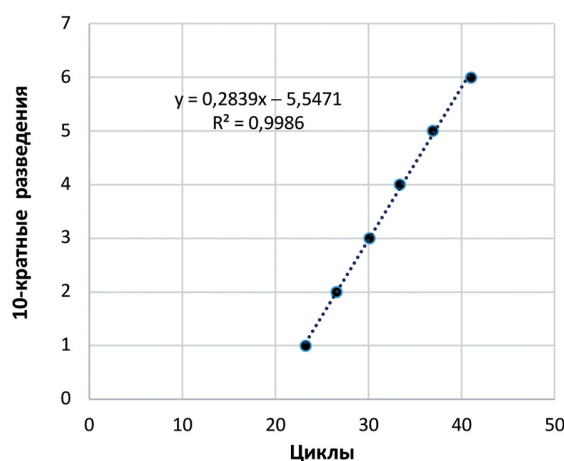
Таблица 2

Значения Ct при выявлении генома *Campylobacter* spp. в ПЦР-РВ ($n = 3$)

№ п/п	Концентрация бактериальных клеток	Конечные ОЕФ	Значение Ct	Среднее значение Ct	Стандартное отклонение $\pm SD$	Результат
1	4×10^5	1163	23,34	23,26	0,072	(+) положительный
2		1337	23,24			(+) положительный
3		1269	23,20			(+) положительный
4	4×10^4	1234	26,62	26,57	0,051	(+) положительный
5		1262	26,59			(+) положительный
6		1286	26,52			(+) положительный
7	4×10^3	1244	30,03	30,07	0,058	(+) положительный
8		1171	30,05			(+) положительный
9		1096	30,14			(+) положительный
10	4×10^2	1093	33,40	33,35	0,044	(+) положительный
11		1065	33,32			(+) положительный
12		1216	33,33			(+) положительный
13	40	1011	37,02	36,91	0,226	(+) положительный
14		980	37,06			(+) положительный
15		1004	36,65			(+) положительный
16	4	-0,668	н/о	41,02	0,035	(-) отрицательный
17		549	41,04			(-) отрицательный
18		501	40,99			(-) отрицательный
19	0,4	-0,666	н/о	-	-	(-) отрицательный
20		-1,05	н/о			(-) отрицательный
21		-3,75	н/о			(-) отрицательный

н/о – не обнаружено.

Геном *Campylobacter* spp. был обнаружен в 18 образцах. Наибольшее количество положительных проб наблюдали при исследовании полуфабрикатов куриных (44,0%). Также геном кампилобактерий выявили в тушках птицы (23,1%), крови птицы (25,0%), сыром молоке (9,1%).

Рис. 2. График линейной регрессии Ct при тестировании 10-кратных разведений ДНК *Campylobacter* spp. в ПЦР-РВ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований была оптимизирована методика, позволяющая выявлять геном *Campylobacter* spp. при наличии приблизительно 40 молекул-мишеней в исследуемом образце. Оптимизированы условия проведения ПЦР-РВ: подобрана оптимальная концентрация магния (2,5 мМ) и температура отжига праймеров (58 °C). Установлено, что выбранные праймеры обладают высокой специфичностью и не дают ложноположительных реакций. Показано, что данная методика обеспечивает точное определение *Campylobacter* spp. (значение R^2 выше 0,99) с эффективностью ПЦР 92,26%.

Методика апробирована в испытаниях 76 образцов сырья животного происхождения (образцы куриной продукции, молоко коровье сырое, биоматериалы куриные). Результаты исследований позволяют сделать заключение о том, что методика является высокоспецифичной, чувствительной и обеспечивает определение *Campylobacter* spp. в исследуемых образцах.

Таким образом, предложенная методика может использоваться в качестве экспресс-метода в дополнение к классическим методам, используемым в рутинном анализе в микробиологических лабораториях. Кроме того, данную методику можно применять при

оценке распространенности *Campylobacter* spp. в пищевой промышленности, а также в сырых и обработанных продуктах животного происхождения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Минаев В. И., Черкасский Б. Л., Минаева Н. З. Лабораторная диагностика кампилобактериоза в современных условиях // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1991. – № 8. – С. 18–21.
- Питательная среда для выделения и культивирования кампилобактерий / З. У. Темирганова, П. Ш. Гашимова, Н. В. Сафонова [и др.] // Микробиология. – 1999. – № 6. – С. 27–30.
- Рекомендации по постановке ПЦР / Евроген. – вер. 18 сентября 2017 г. – URL: <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf>.
- A one-year study of *Campylobacter* carriage by individual Danish broiler chickens as the basis for selection of *Campylobacter* spp. strains for a chicken infection model / D. D. Bang, E. M. Nielsen, K. Knudsen, M. Madsen // Epidemiol. Infect. – 2003. – Vol. 130 (2). – P. 323–333; DOI: 10.1017/S095026880200821x.
- Bronowski C., James C. E., Winstanley C. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni* // FEMS Microbiol. Lett. – 2014. – Vol. 356 (1). – P. 8–19; DOI: 10.1111/1574-6968.12488.
- Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization, and cloning of a species-specific DNA probe / J. Stanley, A. P. Burnens, D. Linton [et al.] // J. Gen. Microbiol. – 1992. – Vol. 138 (11). – P. 2293–2303; DOI: 10.1099/00221287-138-11-2293.
- Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* subsp. nov., isolated from the porcine stomach, and an emended description of *Campylobacter hyointestinalis* / S. L. On, B. Bloch, B. Holmes [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1995. – Vol. 45 (4). – P. 767–774; DOI: 10.1099/0020713-45-4-767.
- Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR / M. Lund, S. Nordentoft, K. Pedersen, M. Madsen // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42 (11). – P. 5125–5132; DOI: 10.1128/JCM.42.11.5125-5132.2004.
- Diversity of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated in laboratory animals / N. S. Taylor, M. A. Ellenberger, P. I. Wu, J. G. Fox // Lab. Anim. Sci. – 1989. – Vol. 39 (30). – P. 219–221; PMID: 2724920.
- Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009 / A. H. Havelaar, S. Ivarsson, M. Löfdahl, M. J. Nauta // Epidemiol. Infect. – 2013. – Vol. 141 (2). – P. 293–302; DOI: 10.1017/S0950268812000568.
- Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* realtime quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples / B. Chaban, S. Chu, S. Hendrick [et al.] // Can. J. Vet. Res. – 2012. – Vol. 76 (3). – P. 166–173; PMID: PMC3384278.
- Fitzgerald C. *Campylobacter* // Clin. Lab. Med. – 2015. – Vol. 35 (2). – P. 289–298; DOI: 10.1016/j.cll.2015.03.001.
- Foodborne illness acquired in the United States – Major pathogens / E. Scallan, R. M. Hoekstra, F. J. Angulo [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 17 (1). – P. 7–15; DOI: 10.3201/eid1701.P11101.
- Global epidemiology of *Campylobacter* infection / N. O. Kaakoush, N. Castaño-Rodríguez, H. M. Mitchell, S. M. Man // Clin. Microbiol. Rev. – 2015. – Vol. 28 (3). – P. 687–720; DOI: 10.1128/CMR.00006-15.
- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective // Int. J. Food Microbiol. – 2007. – Vol. 117 (3). – P. 237–257; DOI: 10.1016/j.jfoodmicro.2007.01.006.
- Huq M., Gonis G., Istivan T. Development and evaluation of a multiplex PCR for the detection of *Campylobacter concisus* and other *Campylobacter* spp. from gastroenteritis cases // Open J. Med. Microbiol. – 2014. – Vol. 4 (1). – P. 29–37; DOI: 10.4236/ojmm.2014.41005.
- Identification of *Campylobacter* isolated from Danish broilers by phenotypic tests and species-specific PCR assays / M. Wainø, D. D. Bang, M. Lund [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2003. – Vol. 95 (4). – P. 649–655; DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01996.x.
- Identification of hyperinvasive *Campylobacter jejuni* strains isolated from poultry and human clinical sources / C. Fearnley, G. Manning, M. Bagnall [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 57 (5). – P. 570–580; DOI: 10.1099/jmm.0.47803-0.
- Infectious agent and immune response characteristics of chronic enterocolitis in captive rhesus macaques / K. Sestak, C. K. Merritt, J. Borda [et al.] // Infect. Immun. – 2003. – Vol. 71 (7). – P. 4079–4086; DOI: 10.1128/iai.71.7.4079-4086.2003.
- Lehtola M. J., Loades C. J., Keevil C. W. Advantages of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence in

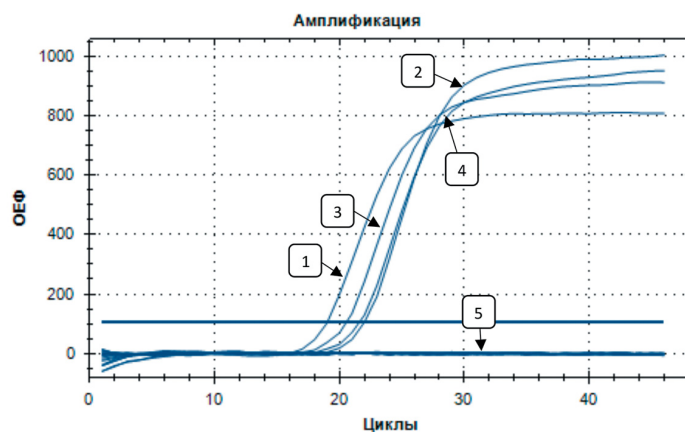


Рис. 3. Определение специфичности ПЦР-РВ при идентификации генома *Campylobacter* spp.

- 1 – положительный контроль;
2 – *Campylobacter jejuni* ATCC 33291;
3 – *Campylobacter coli* ATCC 43478;
4 – *Campylobacter lari* ATCC 35221;
5 – нецелевые штаммы.

Таблица 3

Выявление генома *Campylobacter* spp. в образцах сырья животного происхождения посредством ПЦР-РВ

Номер группы	Наименование образца	Количество проб		
		всего	положительных	%
1	Полуфабрикаты куриные	25	11	44,0
2	Птица	13	3	23,1
3	Молоко коровье сырое	33	3	9,1
4	Кровь птицы	4	1	25,0
5	Смыв с подстилки	1	0	0
Итого		76	18	23,7

situ hybridization (FISH) detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* // J. Microbiol. Methods. – 2005. – Vol. 62 (2). – P. 211–219; DOI: 10.1016/j.mimet.2005.02.009.

21. Man S. M. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2011. – Vol. 8 (12). – P. 669–685; DOI: 10.1038/nrgastro.2011.191.

22. New methods for detection of campylobacters in stool samples in comparison to culture / E. Bessede, A. Delcamp, E. Sifré [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49 (3). – P. 941–944; DOI: 10.1128/JCM.01489-10.

23. Pitkänen T. Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters // J. Microbiol. Methods. – 2013. – Vol. 95 (1). – P. 39–47; DOI: 10.1016/j.mimet.2013.06.008.

24. Rodrigues-Lazaro D., Hernandez M., Pla M. Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay // FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – Vol. 233 (2). – P. 257–267; DOI: 10.1016/j.femsle.2004.02.018.

25. The role of environmental reservoirs in human campylobacteriosis / H. Whitley, B. van den Akker, S. Giglio, R. Bentham // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2013. – Vol. 10 (11). – P. 5886–5907; DOI: 10.3390/ijerph10115886.

26. Whitley H., McLean R., Ross K. Detection of *Campylobacter jejuni* in Lizard faeces from central Australia using quantitative PCR // Pathogens. – 2017. – Vol. 6 (1); DOI: 10.3390/pathogens6010001.

27. Winters D. K., O'Leary A. E., Slavik M. F. Polymerase chain reaction for rapid detection of *Campylobacter jejuni* in artificially contaminated foods // Lett. Appl. Microbiol. – 1998. – Vol. 27 (3). – P. 163–167; DOI: 10.1046/j.1472-765x.1998.00411.x.

Поступила 27.05.19
Принята в печать 30.10.19