

Д. Л. КИРИК (Київ)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ КОНТАМІНАЦІЇ ПРОДУКТІВ ПТАХІВНИЦТВА БАКТЕРІЯМИ РОДУ *CAMPYLOBACTER*

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика <kyryk@ukr.net>

В Україні проблема вивчення молекулярної епідеміології кампілобактеріозу знаходиться на початковій стадії, тому визначення генетичних детермінант патогенності у штамів різного походження є актуальним напрямом епідеміологічних досліджень. Сучасні методи молекулярно-генетичного аналізу, що ґрунтуються на виявленні специфічних для шуканих мікроорганізмів нуклеотидних послідовностей ДНК, значно розширюють можливості виявлення у харчових продуктах важко культивованих патогенних кампілобактерій. Схожість генетичних детермінант патогенності у штамів кампілобактерій, виділених від хворих на гостру кишкову інфекцію та з продуктів птахівництва, підтверджує взаємозв'язок епідемічного й епізоотичного процесів і необхідність організації комплексного молекулярно-епідеміологічного нагляду реформованими системами охорони здоров'я і ветеринарної служби.

Ключові слова: кампілобактеріоз, продукти птахівництва, молекулярно-генетичний контроль, епізоотичний процес, епідеміологічний нагляд.

Проведені у багатьох країнах дослідження показали, що серед гострих кишкових інфекцій (ГКІ) невизначеної етіології важливе значення має кампілобактеріоз, етіологічними агентами якого є бактерії роду *Campylobacter* [7]. Останніми роками активно розвивається сучасний напрям епідеміологічної науки, що використовує методи молекулярної біології для вивчення особливостей епідемічного процесу та їх застосування у системі епідеміологічного нагляду [2]. В Україні проблема вивчення молекулярної епідеміології кампілобактеріозу знаходиться на початковій стадії, тому визначення генетичних детермінант патогенності у штамів різного походження є актуальним напрямом епідеміологічних досліджень.

Мета дослідження – оцінити епідемічну небезпеку продуктів птахівництва на основі визначення генетичних детермінант патогенності у штамів кампілобактерій різного походження.

Матеріали і методи. Проведено бактеріологічне дослідження з метою виявлення бактерій роду *Campylobacter* матеріалу від 716 хворих з ГКІ та 269 проб продуктів птахівництва. Матеріал для бактеріологічного дослідження від хворих з ГКІ (випорожнення) і проби птахопродуктів поміщали у середовище для контролю стерильності (рН = 10), яке використовували як транспортне, у співвідношенні 1 : 5. Перед дослідженням проби птахопродуктів подрібнювали у гомогенізаторі. Для виділення кампілобактерій проводили посів 0,1 мл суспензії матеріалу в транспортному середовищі на дві чашки залізо-еритрит-кров'яного агару (ЗЕКА) з аеротолерантними домішками та антибактеріальним суплементом. Посіви інкубували у мікроаерофільних умовах при 42 °С у мікроаеростаті за допомогою газогенеруючих пакетів «Кампілогаз» («Синтез», Україна). Культивували протягом 48 год з оглядом чашок через кожні 24 год. При ідентифікації виділених культур кампілобактерій використовували такі тести: характер забарвлення за Грамом, рухливість у темному полі, продукування оксидази та каталази, гідроліз гіпурату, чутливість до налідиксової кислоти, здатність росту на середовищі Ресселя при 37 °С в аеробних умовах. Для вивчення генетичних детермінант патогенності відібрано 97 штамів кампілобактерій з продуктів птахівництва і 48 від хворих з ГКІ. Пошук нуклеотидних послідовностей проводили за базами даних GeneBank, EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека), DDBJ (Японська база даних нуклеотидних послідовностей) і Entrez (Національний центр біотехнологічної інформації, США). Екстракцію ДНК здійснювали в автоматичному екстракторі із суспензій добових культур у забуферованому ізотонічному розчині натрію хлориду щільністю 10⁵ КУО/г за оптичним стандартом каламут-

ності. Суміш для полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) містила 0,8 мкмоль кожного праймеру, 1 од. TaqF ДНК-полімерази, 5 × ПЛР-буферу Blue і деіонізованої води. Загальний об'єм реакційної суміші становив 25 мкл, у тому числі 1 мкл екстракту ДНК. Склад праймерів для ПЛР та умови ампліфікації наведено в табл. 1 [4, 6]. Денатурацію проводили при 95 °С 15 хв, потім 30 циклів ампліфікації на ампліфікаторі «Терцик» виробництва НВФ «ДНК-Технологія» (Москва, Росія) за вказаними у табл. 1 умовами. Після закінчення здійснювали однохвилинний етап елонгації при 72 °С. Розподіл продуктів ампліфікації проводили у 0,1 % агаровому гелі, що містив ТБЕ-буфер та етидій бромід. Витраmano такі умови форе-зу: 120 В, 80–100 мА протягом 25–30 хв.

Таблиця 1. Склад праймерів для полімеразно-ланцюгової реакції та умови ампліфікації для визначення генетичних детермінант патогенності у штамів кампілобактерій різного походження

Праймер	Послідовність 5'→3'	Цільовий ген	Умови ампліфікації
VirBF	GAACAGGAAGTGGAAAACTAGC	VirBII	94C-4", 51C-4", 72C-4"
VirBR	TTCCGCATTTGGGCTATATG		
VirB8 FWD	GCCATTACTTTTCTTGCCCC	VirB8	94C-4", 50C-4", 72C-4"
VirB8 REV	CGCTCCTTTCGTTTGTGTG		
VirB9 FWD	GTTCCSTAACCSTAATGCAAAAC	VirB9	94C-4", 58C-4", 72C-4"
VirB9 REV	CTACACATACATAACTATCTCC		
GNW	GGA AAT TGGATTTGGGGCTATACT	CdtA	94C-2", 51C-2", 72C-2"
IVH	ATCACAAGGATAATGGACAAT		
VAT2	GT TAAAATCCCCTGSTATCAACCA	CdtB	94C-2", 51C-2", 72C-2"
WMI-R	GTTGGCACTTGG AATTTGCAAGGC		
WMI-F	TGGATGATAGCAGGGGATTTTAAC	CdtC	94C-2", 51C-2", 72C-2"
LPF-X	TTGCACATAACCAAAGGAAG		

Для обліку результатів ампліфікації використовували камеру документування електрофоре-зу (виробництво НВФ «ДНК-Технологія», Москва, Росія) з програмним забезпеченням «GEL IMAGER». Статистичну обробку результатів дослідження здійснювали методами варіаційної статистики після створення бази даних в Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення. Бактерії роду *Campylobacter* дуже чутливі до умов культивування (наявність CO₂ і кисню, крові, селективних домішок), культуральні методи їх аналізу досить трудомісткі та багатетапні. При цьому завжди є ризик втрати кампілобактерій через порушення умов інкубації або контамінації сторонньою мікрофлорою. Сучасні методи молекулярно-генетичного аналізу, що ґрунтуються на виявленні специфічних для шуканих мікроорганізмів нуклеотидних послідовностей ДНК, значно розширюють можливості виявлення у харчових продуктах важко культивованих патогенних мікроорганізмів [1].

У штамів *C. jejuni*, виділених від хворих з ГКІ та з продуктів птахівництва, вивчали гени патогенності, що відповідають за продукування цитолетального токсину (ЦЛТ): CdtA, CdtB, CdtC та інвазію: VirB8, VirB9, VirB11. Синдром діареї можливий тільки при комплексній дії трьох субодиниць ЦЛТ [5]. Отримані продукти ампліфікації зазначеного гена порівнювали з наведеними у літературі [3]. У всіх штамів, виділених з продуктів птахівництва, визначено два гени ЦЛТ – CdtA, CdtC (табл. 2). Проте всі три субодиниці ЦЛТ частіше виявляли у пробах з охолодженого м'яса – 68,6 % штамів. Це підтверджує його провідне значення як фактора передачі кампілобактеріозу для людей.

При вивченні субодиниць генів ЦЛТ у штамів кампілобактерій, виділених від хворих з ГКІ, встановлені гени CdtA і CdtC у 100 %, а ген CdtB – у 73 %. Генетичні детермінанти інвазивності – VirB8 і VirB11 – також були ідентифіковані тільки у клінічних штамів та штамів, виділених з проб охолодженого м'яса. При

проведенні епідеміологічного обстеження осередків кампілобактеріозу встановлено, що продукти птахівництва були фактором передачі в 57 % випадків.

Таблиця 2. Поширення генетичних детермінант патогенності у штамів кампілобактерій різного походження

Джерело виділення	Кількість штамів	Частота визначення, % ± m					
		Детермінанти цитолетальності			Детермінанти інвазивності		
		CdtA	CdtB	CdtC	VirB8	VirB9	VirB11
Хворі з ГКІ	48	100	73,0 ± 6,4	100	43,8 ± 7,2	0	37,5 ± 7,0
М'ясо охолоджене	35	100	68,6 ± 7,8	100	42,9 ± 8,4	0	34,3 ± 8,0
М'ясо заморожене	32	100	33,0 ± 8,3	100	0	0	0
Печінка	30	100	30,0 ± 8,3	100	0	0	0
Всього	145	100	54,5 ± 4,1	100	24,8 ± 3,6	0	20,7 ± 3,4

Удосконалення методів аналізу харчових продуктів на наявність в них збудників ГКІ, в тому числі бактерій роду *Campylobacter*, – одне з найактуальніших завдань профілактичної медицини. Це зумовлює необхідність включення мікробіологічних досліджень до системи профілактики ГКІ, а також проведення моніторингу патогенних мікроорганізмів у харчових продуктах. Такий моніторинг повинен ґрунтуватися на використанні високоспецифічних молекулярно-генетичних методів, що потрібно для контролю ефективності протиепідемічних заходів на м'ясоптахопереробних підприємствах і зниження перехресної контамінації.

Висновок. Схожість генетичних детермінант патогенності у штамів кампілобактерій, виділених від хворих з ГКІ та з продуктів птахівництва, підтверджує взаємозв'язок епідемічного й епізоотичного процесів і необхідність організації комплексного молекулярно-епідеміологічного нагляду реформованими системами охорони здоров'я і ветеринарної служби.

Список літератури

1. Дерябін О. М., Пустовіт Н. А., Виговська Л. М. Розробка ПЛР тест-системи «*Campylobacter* spp. – ПЛР тест» для виявлення та ідентифікації ДНК бактерій роду *Campylobacter* // Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та ДНКІ ветеринарних препаратів. – 2014. – Вип. 15, № 2–3. – С. 278–282.
2. Кирик Д. Л. Молекулярні методи у мікробіологічній діагностичній практиці і епідеміологічному аналізі (лекція) // Профілакт. медицина. – 2015. – № 1–2. – С. 127–135.
3. Bang D. D., Borck B., Nielsen E. M. et al. Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Danish turkeys by PCR and cytolethal distending toxin production of the isolates // J. Food Prot. – 2004. – Vol. 67, N 10. – P. 2171–2177.
4. Kabir S. M., Kikuchi K., Asakura M. et al. Evaluation of cytolethal distending toxin(cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from diarrheal patients in Japan // Jpn. J. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 64, N 2. – P. 19–27.
5. Lara-Tejero M., Galan J. E. CdtA, CdtB and CdtC a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity // Infect. Immun. – 2001. – Vol. 69, N 7. – P. 4358–4365.
6. Talukder K. A., Aslam M., Islam Z. et al. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46, N 4. – P. 1485–1488.
7. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014 // EFSA J. – 2015. – Vol. 4329, N. 12. – 191 p.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПРОДУКТОВ ПТИЦЕВОДСТВА БАКТЕРИЯМИ РОДА *CAMPYLOBACTER*

Д. Л. Кирик (Київ)

В Украине проблема изучения молекулярной эпидемиологии кампилобактериоза находится в начальной стадии, поэтому определение генетических детерминант патогенности у штам-

мов различного происхождения является актуальным направлением эпидемиологических исследований. Современные методы молекулярно-генетического анализа, основанные на выявлении специфических для искомым микроорганизмов нуклеотидных последовательностей ДНК, значительно расширяют возможности выявления в пищевых продуктах трудно культивируемых патогенных кампилобактерий. Сходство генетических детерминант патогенности у штаммов кампилобактерий, выделенных от больных с острой кишечной инфекцией и из продуктов птицеводства, подтверждает взаимосвязь эпидемического и эпизоотического процессов и необходимость организации комплексного молекулярно-эпидемиологического надзора за реформированными системами здравоохранения и ветеринарной службы.

Ключевые слова: кампилобактериоз, продукты птицеводства, молекулярно-генетический контроль, эпизоотический процесс, эпидемиологический надзор.

MOLECULAR-GENETIC CONTROL OF CONTAMINATION OF POULTRY PRODUCTS WITH BACTERIA OF THE GENUS *CAMPYLOBACTER*

D. L. Kyryk (Kyiv, Ukraine)

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education

In Ukraine the problem of studying the molecular epidemiology of campylobacteriosis is still in its infancy, therefore, the definition of genetic determinants of pathogenicity in strains of different origins is an important way of epidemiological studies. Modern methods of molecular genetic analysis, based on the identification of specific desired nucleotide sequences microbial DNA, greatly enhance the possibility of detection in food products is difficult cultivated by pathogenic *Campylobacter*. The similarity of genetic determinants of pathogenicity of *Campylobacter* strains, isolated from patients with AII and poultry products, confirms the presence of the relationship of epidemic and epizootic processes and the need for comprehensive molecular epidemiological surveillance of a reformed health systems and veterinary services.

Key words: campylobacteriosis, poultry products, molecular genetic control, epizootic process, epidemiological surveillance.