

УДК 619:616-07

## РАЗРАБОТКА ПЦР-ТЕСТА ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ *C. COLI*, *C. JEJUNI*, *C. FETUS*

А.Б. Шевцов<sup>1</sup>, А.Д. Каиржанова<sup>1</sup>, Г.Д. Абишева<sup>1</sup>, Е.С. Шевцова<sup>1</sup>, Д.К. Камалова<sup>1</sup>,  
А.С. Джайлбекова<sup>2</sup>, Т.Б. Карибаев<sup>2</sup>, И.И. Сытник<sup>2</sup>, А.Е. Ахметова<sup>2</sup>, К.К. Муканов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный центр биотехнологии, ул. Ш. Валиханова, 13/1, Астана, 010000,  
Казахстан

<sup>2</sup>Национальный референтный центр по ветеринарии, ул. 150 лет Абая, 223, (Коктал),  
Астана, 010000, Казахстан  
ncbshevtsov@gmail.com

### АБСТРАКТ

Низкая эффективность бактериологических методов диагностики кампилобактериоза указывает на перспективность разработки и внедрение ПЦР-тестов для выявления клинически значимых видов кампилобактерий. Целью настоящей работы является разработка высокоэффективного ПЦР теста для выявления и видовой дифференциации *C. coli*, *C. jejuni* и *C. fetus* в клиническом материале и продуктах животноводства.

Оценка чувствительности, проведенная на двукратно разведенных образцах ДНК, позволила определить аналитический предел чувствительности в 108 геномных эквивалентов для *C. coli* и *C. fetus* и 13,7 геномный эквивалент для *C. jejuni*. Оценка специфичности ПЦР-теста на ДНК 10 видов кампилобактерий, ДНК генетически близкого вида *H. pylori*, а также ДНК бактерий, вызывающих инфекционные заболевания животных и человека доказала высокую специфичность теста.

Высокая аналитическая чувствительность и специфичность позволяют использовать разработанный тест в экспресс диагностике кампилобактериоза, а также проводить анализ контаминации продуктов животноводства *C. coli*, *C. fetus* и *C. jejuni*.

**Ключевые слова:** кампилобактерии, ПЦР-диагностика, специфичность, чувствительность, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*.

## DEVELOPMENT PCR TEST FOR SPECIFIC IDENTIFICATION *C. COLI*, *C. JEJUNI*, *C. FETUS*

A.B. Shevtsov<sup>1</sup>, A.D. Kairzhanova<sup>1</sup>, G.D. Abisheva<sup>1</sup>, E.S. Shevtsova<sup>1</sup>, D.K. Kamalova<sup>1</sup>,  
A.S. Dzhaibekova<sup>2</sup>, T.B. Karibaev<sup>2</sup>, I.I. Sytnik<sup>2</sup>, A.E. Ahmetova<sup>2</sup>, K.K. Mukanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Center for Biotechnology, 13/1, Valikhanov str., (Koktal) Astana, 010000,  
Kazakhstan

<sup>2</sup>National Reference Center on Veterinary, 223, 150 let Abaya str., (Koktal) Astana, 010000,  
Kazakhstan  
ncbshevtsov@gmail.com

### ABSTRACT

At this time, the laboratories responsible for diagnostics of campylobacteriosis and evaluation of the animal products contamination by campylobacteria use “golden standard” – extraction and identification of clean cultures. However, campylobacteria microaerophiles grow on complex growth medium and require high qualified staff. The diagnostics is also complicated due to diversity of clinical campylobacteriosis. As a result there is an underestimation of the true campylobacteriosis situation in the structure of the human and animal infectious diseases. Introduction of the PCR tests into diagnostic laboratories may simplify and increase the level of campylobacteriosis infections diagnostics. The aim of the work was development of high PCR test for identification of species differentiation of *C. coli*, *C. jejuni* and *C. fetus* in clinical material and animal products. In the research the primers selected to the unique DNA markers *Cc01460c* for *C. coli* and *Cj0339* for *C. jejuni* were used; for species differentiation of *C. fetus* primers for *rpoB* gene were selected. The conditions were

optimized by real-time PCR using intercalating dye SybrGreen, which allowed evaluating the maximum efficiency on basis of minimum value of threshold cycle ( $C_t$ ). As a result the protocol with optimized composition of reaction mixture and PCR amplification program was developed. Sensitivity evaluation on two-fold diluted DNA samples has allowed identifying analytical sensitivity threshold in 108 genomic equivalents for *C. coli* and *C. fetus* and 13.7 genomic equivalent for *C. jejuni*. The sensitivity evaluation of the PCR test on DNA of 10 campylobacteria types, DNA of genetically related *H. pylori*, as well as DNA of the bacteria that cause human and animal infectious diseases similar to the clinical picture, has proved high test specificity. High analytical sensitivity and specificity allow to use the developed test in express diagnostics of campylobacteriosis as well as to analyze contamination of animal products by *C. coli*, *C. fetus* and *C. jejuni*.

**Keywords:** campylobacter, PCR diagnostics, specificity, sensitivity, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*.

---

## ВВЕДЕНИЕ

Род *Campylobacter* включает несколько видов, вызывающих кампилобактериозы у животных, людей и птиц, с преобладающим тропизмом к желудочно-кишечному тракту и репродуктивной системе. Кампилобактериоз характеризуется различной степенью тяжести проявления заболевания и полиморфностью клинических проявлений. Кампилобактерии наносят значительный ущерб сельскому хозяйству, связанный со снижением продуктивности животных, затратами на диагностические исследования и проведением противоэпизоотических мероприятий.

Наиболее патогенными для жвачных животных являются *C. fetus* subsp *fetus* и *C. fetus* subsp *veneralis*.

*C. fetus* subsp *veneralis* классифицируется как возбудитель генитального кампилобактериоза (вибриоз – BVS) крупного рогатого скота. У коров колонизирует эпителиальные клетки влагалища, канала шейки матки, матки, рога матки, а у быков локализуется преимущественно в препуциальной полости [1]. Клиническое проявление характеризуется воспалительным процессом органов репродуктивной системы, что приводит к абортam, частым перегулам и бесплодию [2]. Частое бессимптомное носительство и пожизненное персистирование являются главными факторами передачи инфекции [3].

*C. fetus* subsp. *fetus* является облигатной микрофлорой желудочно-кишечного тракта жвачных, но также может являться причиной спорадических абортam [4]. Например, в Дании 60% бактериальных абортam овец ассоциируется с инфицированием *C. fetus* subsp. *fetus* [5]. В Новой Зеландии данный вид кампилобактерий также является основным этиологическим агентом абортam у овец [6]. В эпидемиологии *C. fetus* subsp. *fetus* рассматривается как оппортунистический возбудитель, способный вызывать острые инфекции, особенно у пожилых и людей с ослабленным иммунитетом [7]. Инфицирование, как правило, происходит алиментарным путем при употреблении контаминированных продуктов, возможна передача возбудителя при непосредственном контакте с животными [8, 9]. Клинически заболевание проявляется острой диареей, но у людей с ослабленным иммунитетом может наблюдаться сепсис, перитонит, эндо- и перикрадит, менингоэнцефалиты и остеоартриты [10].

Животные и птицы являются естественными резервуарами термофильных кампилобактерий *C. jejuni* и *C. coli* [11]. При этом отмечается высокий процент бактерионосительства среди домашних животных, например, исследование ферм ряда европейских стран позволило установить следующее среднестатистическое распределение инфицированности: молочный скот – 67,1%, мясной скот – 58,9%, мелкий рогатый скот – 55,0%, свиньи – 52,9% [12, 13, 14]. В редких случаях у крупного рогатого скота *C. jejuni* может служить причиной абортam, маститов и дизентерии молодняка [15]. Процент бактерионосительства у птиц выше, чем у животных и варьирует в пределах 55-79% [16].

Зараженные животные, птицы и контаминированная продукция животноводства являются основной причиной инфицирования людей термофильными кампилобактериями. В странах ЕС кампилобактериоз относится к самым распространённым зоонозам 45,6-106

случаев на 100000 населения [17]. Аналогичная ситуация наблюдается в США, где заболеваемость кампилобактериозом в 1,5-2 раза выше сальмонеллёзной инфекции [18]. Эпидемиологические исследования доказали, что 55-80% случаев кампилобактериоза людей связаны с потреблением продуктов, полученных от домашней птицы, а также крупного и мелкого рогатого скота – 20-40% [19].

Полиморфизм клинических проявлений у животных и людей не позволяет поставить диагноз «кампилобактериоз» без лабораторного подтверждения. Поэтому диагностика кампилобактериоза является краеугольным камнем в борьбе с данной инфекцией. Микробиологическая диагностика кампилобактериоза трудоемкая, многозатратная процедура, что связано с биологическими свойствами возбудителя.

Отсутствие стандартов диагностики кампилобактериоза на территории СНГ привело к искажению реальной картины распространенности кампилобактериоза. Так, в России официально регистрируется 0,32 случая на 100 тыс. населения, в Украине показатель этот составляет 1 случай на 100 тыс. населения в год [20, 21].

Внедрение полимеразной цепной реакции (ПЦР) может способствовать повышению эффективности диагностики кампилобактериоза и улучшить контроль качества животноводческой продукции [22, 23].

Целью данных исследований являлась разработка ПЦР для выявления и видовой дифференциации *C. coli*, *C. jejuni* и *C. fetus*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы:

- Образцы ДНК *C. upsaliensis* DSM 5365, *C. lari* subsp. *lari* DSM 11375, *C. fetus* subsp. *venerealis* DSM 18826, *C. coli* DSM 4689, *C. fetus* subsp. *fetus* DSM 5361, *C. concisus* DSM 9716, *C. showae* DSM 19458, *C. gracilis* DSM 19528, *C. jejuni* subsp. *jejuni* DSM 4688, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* DSM 19053, *C. mucosalis* DSM 21682, *C. rectus* DSM 3260, приобретенные в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур [24].

- Образцы ДНК *H. pylori*, *B. abortus*, *L. monocytogenes*, *P. multocida*, *S. enteritidis*, *E. coli*, депонированные в коллекции микроорганизмов РГП «Национальный референтный центр по ветеринарии» Комитета ветеринарного контроля и надзора МСХ РК.

Видовая принадлежность образцов ДНК бактерий была подтверждена анализом нуклеотидной последовательности *16S rRNA* гена.

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDrop.

Анализ амплифицированных целевых фрагментов ДНК проводили методом разделения фрагментов ДНК в агарозном геле (концентрация агарозы от 1,5-2%, в зависимости от длины анализируемого фрагмента), в присутствии интеркалирующего агента – бромистого этидия, который был использован с целью дальнейшей визуализации ДНК. Электрофорез проводили в камере горизонтального электрофореза PowerPac с источником тока BioRad Electrophoretic bath (Bio-Rad, США). В качестве электродного буфера использовали 1x TAE-буфер (40 mM Трис-основной, 20 mM уксусной кислоты, 1 mM ЭДТА).

Документирование полученных результатов проводили с использованием системы документаций гелей Gel Doc, (Bio-Rad, США), с программным обеспечением QuantityOne (Bio-Rad, США). Размеры молекул анализируемых образцов ДНК определяли путем сопоставления их электрофоретической подвижности в геле с подвижностью маркеров – фрагмент ДНК известной молекулярной массы. В качестве маркера молекулярных масс использовали «DNA Ladder 1kb» (Ferments).

Подбор и проверку специфических праймеров проводили с использованием программ Primer Select (DNASTAR) и BioEdit и веб-ресурса PrimerBlast (NCBI). При подборе праймеров учитывали основные параметры: близкая температура отжига прямого и

обратного праймера, длина праймеров от 18-25 п.н, а также низкая вероятность образования вторичных структур.

Оценку чувствительности проверяли на ряде двукратных разведений ДНК *C. coli* DSM, *C. fetus* subsp. *fetus* DSM 5361, *C. jejuni* subsp. *jejuni* DSM 4688. Специфичность протокола определяли методом постановки ПЦР на контрольных образцах ДНК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Праймеры играют ключевую роль в чувствительности и специфичности ПЦР-реакции. Поэтому выбору ДНК мишени и структуре праймеров уделяется огромное влияние при разработке ПЦР. Выбор ДНК мишеней для видовой идентификации *C. coli* и *C. jejuni* был основан на результатах полногеномного анализа 192 штаммов, проведенный G. Meric с соавторами, который позволил выделить генетические маркеры, характерные для каждого вида. В результате в качестве целевых маркеров для *C. coli* была выбрана нуклеотидная последовательность *Cc01460c* гена, а для *C. jejuni* последовательность *Cj0339* гена [25]. В качестве целевой мишени ДНК *C. fetus* использовался *rpoB* ген. Подобранные праймеры приведены в таблице 1

**Таблица 1.** Нуклеотидная последовательность праймеров

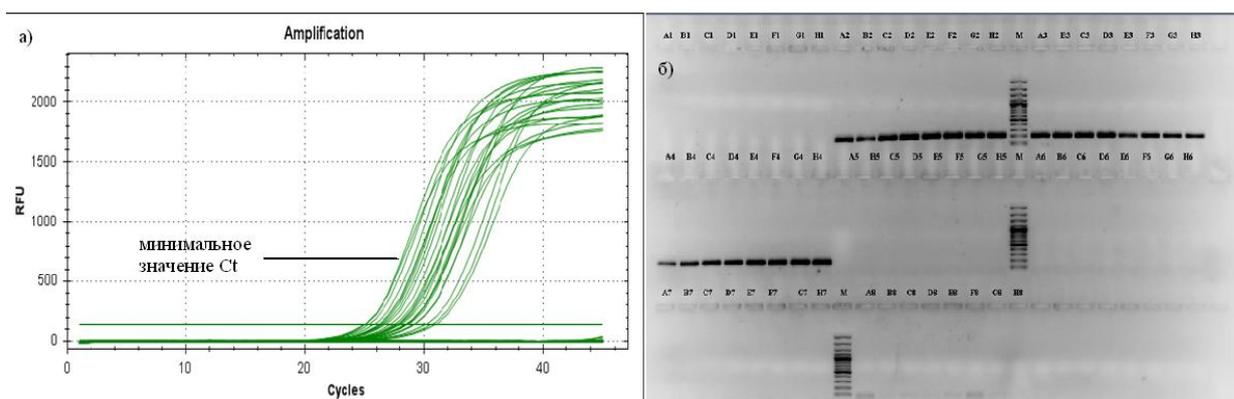
**Table 1.** Nucleotide sequence of primers

Наименование Name	Последовательность 5'-3' Sequence 5'-3'	Размер амплифицируемых фрагментов пар нуклеотидов (п.н.) Size of the amplified fragments of base pairs (bp)
cj0339-R	GGTCCATTTTCGCCTATTC	330
cj0339-F	AGGGCTTGTTTCTTCTGTG	
C.c 01460-f1	CAAGCCATCTTACCATAGCA	193
C.c 01460-r1	GCTAGATATTGTTTGATGGATACT	
C.f. rpoB_f	CATTCTCTCACTCATAACAATAGC	518
C.f. rpoB_r	AAAGAGAAGACGTAACATTGATAG	

Важными компонентами в стратегии повышения специфичности и чувствительности ПЦР является оптимизация концентрации ионов магния, температуры отжига праймеров, присадок повышающих эффективность реакции или стабилизирующих ферментов [26]. Важную роль в тест-системах играет увеличение вязкости реакционной смеси для прямого внесения образцов в агарозный гель. На основании анализа литературных данных для повышения стабильности полимеразы и эффективности амплификации были выбраны бетаин и тетраметиламмония хлорид в низкой концентрации [27, 28]. Повышение вязкости реакционной смеси было достигнуто добавлением сахарозы [29].

Оптимизацию условий проводили методом постановки ПЦР в режиме реального времени, в качестве интеркалирующего красителя использовали SybrGreen (Sigma, S9430). ПЦР-реакция выполнялась на CFX 96 (BioRad, США) с использованием функции градиента температур,  $\pm 4^\circ\text{C}$  от расчетной температуры отжига праймеров. В качестве отрицательного контроля использовали ДНК генетически близкого вида кампилобактерий. На основе филогенетических данных *C. coli* и *C. jejuni* являются генетически близкими видами, поэтому ДНК *C. coli* использовали в качестве контрольного образца при оптимизации

условий с праймерами, подобранными к *Cj0339* гену. ДНК *C. jejuni* использовалась в качестве контрольного образца при оптимизации праймеров, подобранных к *Cc01460c* гену. При оптимизации условий ПЦР для видовой идентификации *C. fetus* в качестве контрольного образца использовали ДНК *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*. При каждой постановке ПЦР оптимизировали один компонент реакции. Оптимальным считался состав реакционной смеси, при котором было выявлено минимальное значение порогового цикла (Ct) и отсутствовала какая-либо неспецифическая амплификация на ДНК генетически близкого вида. Для исключения выявления флуоресцентного сигнала от праймеров димеров проводили электрофоретический учет ПЦР-реакции. На рисунке 1 приведен процесс оптимизации условий для выявления *C. coli* при концентрации ионов магния от 1,5 до 3,0 mM в градиенте температур.



а – кривые накопления флуоресцентного сигнала; б – электрофореграмма ПЦР-продуктов

**Рис. 1.** Результаты оптимизации условий для выявления *C. coli*

а – accumulation curves of the fluorescent signal; в – electrophoretogram of the PCR product

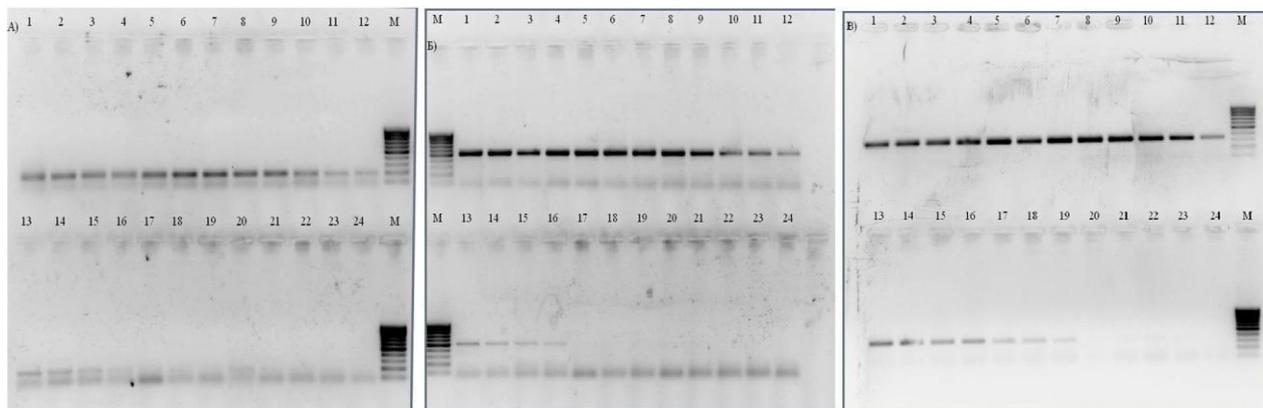
**Fig. 1.** Results of optimization conditions for identifying *C. coli*

Наименьшее значение порогового цикла, приведенное на рисунке 1а, соответствовало температуре отжига 58°C, при концентрации ионов магния 3,0 mM. Важно отметить, что накопление флуоресцентного сигнала не наблюдалось в лунках, содержащих ДНК контрольного образца, а также в лунках с ДНК *C. coli* при концентрации магния 1,5 mM. Это также можно наблюдать в результатах электрофоретического учета (рисунок 1б): А1-Н1 *C. coli*, концентрация магния 1,5 mM; А2-Н2 *C. coli*, концентрация магния 2,0 mM; А3-Н3 *C. coli*, концентрация магния 2,5 mM; А4-Н4 *C. coli*, концентрация магния 3,0 mM; А5-Н5 *C. jejuni*, концентрация магния 1,5 mM; А6-Н6 *C. jejuni*, концентрация магния 2,0 mM; А7-Н7 *C. jejuni*, концентрация магния 2,5 mM; А8-Н8 *C. jejuni*, концентрация магния 3,0 mM.

На основании полученных результатов был разработан протокол видовой идентификации *C. fetus*, *C. jejuni* и *C. coli*, включающий оптимальный состав реакционной смеси и программу ПЦР-амплификации. Реакционная смесь: праймеры по 10 пмол каждого, 10 mM Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 50 mM KCl, 0,08% нонидет Р40, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, дНТФ в концентрации 300 нМ каждого, 5 нМ тетраметиламмония хлорида, 7% сахарозы, ксилен цианол 10 мг/мл, бетаин – до финальной концентрации 0,2M, 1,5 единицы Taq-полимеразы (Fermentas). Программа ПЦР-амплификации: длительная денатурация 95°C-5 минут; 42 цикла 95°C – 30 секунд, 58°C – 30 секунд, 72°C – 45 секунд; финальная элонгация 5 минут при 72°C.

Для оценки чувствительности приготовлен ряд двукратных разведений ДНК трех видов кампилобактерий *C. fetus*, *C. jejuni* и *C. coli* (таблица 2). Постановка ПЦР выполнялась по разработанному протоколу. Результаты электрофоретического анализа показали линейное

уменьшение интенсивности окраски целевых бендов и их полное исчезновение на 17 лунке для *C. coli* и *C. fetus* и на 20 лунке для *C. jejuni* (рисунок 2). Таким образом, чувствительность для *C. coli* и *C. fetus* составила 213 фг (фемтограмм) или 108 геномных копий (копийность рассчитывали с помощью интернет-ресурса <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>). Чувствительность для *C. jejuni* составила 26,7 фг или 13,7 геномной копии.



а – титр ДНК *C. coli*; б – титр ДНК *C. fetus*; в – титр ДНК *C. jejuni*; 1-24 – образцы согласно таблице 2; М – маркер молекулярного веса (100-1000 п.н., шаг 100 п.н.)

**Рис. 2.** Электрофореграмма результатов оценки чувствительности

а – *C. coli* DNA titer; б – *C. fetus* DNA titer; в – *C. jejuni* DNA titer Samples; 1-24 – according to Table 2; М – molecular weight marker (100-1000 bp, 100 bp step)

**Fig. 2.** Electrophoregram of results of the sensitivity evaluation

**Таблица 2.** Концентрация ДНК при оценке чувствительности

**Table 2.** The concentration of DNA in the evaluation of the sensitivity

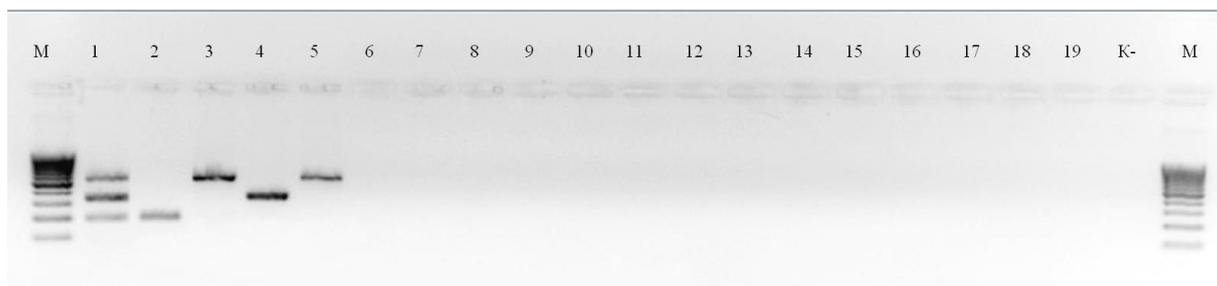
Номер п/п Number	Концентрация ДНК нг DNA concentration ng	Номер п/п Number	Концентрация ДНК нг DNA concentration ng	Номер п/п Number	Концентрация ДНК нг DNA concentration ng
1	7 нг	9	27,34 пг	17	106,8 фг
2	3,5 нг	10	13,67 пг	18	53,4 фг
3	1,75 нг	11	6,83 пг	19	26,7 фг
4	875 пг	12	3,42 пг	20	13,35 фг
5	437,5 пг	13	1,71 пг	21	6,68 фг
6	218,75 пг	14	854,5 фг	22	3,34 фг
7	109,37 пг	15	427,25 фг	23	1,67 фг
8	54,7 пг	16	213,6 фг	24	отрицательный контроль

Оценка специфичности ПЦР-теста была проверена на 19 коллекционных образцах ДНК (таблица 3). В выборку были включены образцы ДНК 10 видов кампилобактерий, ДНК генетически близкого вида *H. pylori*, а также ДНК бактерий, вызывающих инфекционные заболевания животных и человека со сходной клинической картиной. Концентрация ДНК в реакционной смеси варьировала от  $1 \cdot 10^6$  до  $3 \cdot 10^6$  геномных эквивалентов. Электрофоретический учет результатов представлен на рисунке 3.

**Таблица 3.** Перечень образцов ДНК, используемых для проверки специфичности ПЦР-теста

**Table 3.** List of the DNA samples used to test the specificity of the PCR test

№ п/п	Наименование Name	№ п/п	Наименование Name
1	Смесь ДНК <i>C.coli</i> , <i>C. fetus</i> , <i>C. Jejuni</i> DNA mixture <i>C. coli</i> , <i>C. fetus</i> , <i>C. jejuni</i>	11	<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i> DSM 19053
2	<i>C. coli</i> DSM 4689	12	<i>C. mucosalis</i> DSM 21682
3	<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> DSM 5361	13	<i>C. rectus</i> DSM 3260
4	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> DSM 4688	14	<i>H. pylori</i>
5	<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> DSM 18826	15	<i>B. abortus</i>
6	<i>C. upsaliensis</i> DSM 5365	16	<i>L. monocytogenes</i>
7	<i>C. lari</i> subsp. <i>lari</i> DSM 11375	17	<i>P. multocida</i>
8	<i>C. showae</i> DSM 19458	18	<i>S. enteritidis</i>
9	<i>C. concisus</i> DSM 9716	19	<i>E. coli</i>
10	<i>C. gracilis</i> DSM 19528	К-	ТЕ –буфер TE –buffer



1-19 – образцы ДНК согласно таблице 3; «К-» – отрицательный контроль; М – маркер молекулярного веса (100-1000 п.н., шаг 100 п.н.)

**Рис. 3.** Электрофореграмма оценки специфичности ПЦР-теста видовой дифференциации *C. coli*, *C. fetus*, *C. jejuni*

1-19 – DNA samples shown in Table 3; "K" – negative control; M – molecular weight marker (100-1000 bp, 100 bp step)

**Fig. 3.** Electrophoregram of specificity evaluation of the PCR test of *C.coli*, *C. fetus* and *C. jejuni* species differentiation

В результате исследований установлено, что разработанный ПЦР-тест обеспечивает специфическую амплификацию целевых участков генома *C. coli*, *C. fetus*, *C. jejuni* и подобранные праймеры высокоспецифичны, так как в образцах ДНК гетерологических кампилобактерий, генетически близких микроорганизмов, а также бактерий, вызывающих другие инфекционные заболевания, ПЦР-продукты не образуются.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время для диагностики кампилобактериоза и выявления контаминации продуктов животноводства кампилобактериями используют «золотой стандарт» – выделение и идентификация чистых культур. Однако, кампилобактерии микроаэрофилы, растут на сложных питательных средах, требуют высокой квалификации персонала. Диагностика усложняется разнообразием клинических проявлений кампилобактериоза. Все это приводит к недооценке истинной картины распространенности кампилобактериоза в структуре инфекционных заболеваний животных и человека. Внедрение ПЦР-тестов в диагностических лабораториях может упростить и повысить эффективность диагностики кампилобактериозных инфекций.

В ходе исследования предложена ПЦР тест-система для выявления трех видов кампилобактерий. Высокая аналитическая чувствительность и специфичность позволяют использовать разработанный тест в экспресс-диагностике кампилобактериоза, а также для выявления контаминации продуктов животноводства *C. coli*, *C. fetus* и *C. jejuni*.

### Финансирование

Работа выполнялась по проекту «Разработка ПЦР тест-систем для диагностики кампилобактериоза животных и птиц» в рамках реализации государственного заказа по бюджетной программе 055 «Научная и/или научно-техническая деятельность» по подпрограмме 101 «Грантовое финансирование научных исследований».

### ЛИТЕРАТУРА

1. Blaser M.J., Newell D.G., Thompson S.A., Zechner E.L. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections // *Campylobacter* Washington DC. – 2008. – P. 401-428.
2. Campero C.M., Anderson M.L., Walker R.L., Blanchard P.C., BarBano L., Chiu P., Martinez A., Combessies G., Bardon J.C., Cordeviola J. Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions // *J Vet Med.* – 2005. – №53(3). – P. 138-141.
3. Smibert R.M. The genus *Campylobacter* // *Annu Rev Microbiol.* – 1978. – №32. – P. 673-709.
4. Zhao H., Liu H., Du Y., Liu S., Ni H., Wang Y., Wang C., Si W., Yang J., Ling J. Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Campylobacter fetus* in cattle // *Res. Vet. Sci.* – 2010. – Vol. 88. – P. 446-451.
5. Agerholm J.S., Aalbaek B., Fog-Larsen A.M., Boye M., Holm E., Jensen T.K., Lindhardt T., Larsen L.E., Buxton D. Veterinary and medical aspects of abortion in Danish sheep // *APMIS.* – 2006. – Vol. 114. – P. 146-52.
6. Mannering S.A., West D.M., Fenwick S.G., Marchant R.M. & O'Connell K. Pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* sheep abortion isolates // *Vet. Microbiol.* – 2006. – Vol. 115. – P. 237-242.
7. Blaser M.J. *Campylobacter fetus*-emerging infection and model system for bacterial pathogenesis at mucosal surfaces // *Clin Infect Dis.* – 1998. – №2. – P. 256-258.
8. Ichiyama S., Hirai S., Minami T., Nishiyama Y., Shimizu S., Shimokata K., Ohta M. *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* cellulitis associated with bacteremia in debilitated hosts // *Clin Infect Dis.* – 1998. – №2. – P. 252-255.
9. Rennie R.P., Strong D., Taylor D.E., Salama S.M., Davidson C., Tabor H. *Campylobacter fetus* diarrhea in a Hutterite colony: epidemiological observations and typing of the causative organism // *J Clin Microbiol.* – 1994. – №232(3). – P. 721-724.
10. Sprenger H., Zechner E.L., Gorkiewicz G. So close and yet so far - Molecular Microbiology of *Campylobacter fetus* subspecies // *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* – 2012 – №2. – P. 66-75. doi: 10.1556/EuJMI.2.2012.1.10. Epub 2012 Mar 17.

11. Açıık M.N., Cetinkaya B. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy cattle and sheep // *J Med Microbiol.* – 2006. – №55. – P. 331-334.
12. Stanley K. and Jones K. (2003) Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter* // *J Appl Microbiol.* – №94. – P. 104-113.
13. Oporto B., Esteban J.I., Aduriz G., Juste R.A. and Hurtado A. Prevalence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle, sheep and swine farms // *Journal of Applied Microbiology.* – 2007. – №103. – P. 977-984.
14. Alter T., Gaull F., Kasimir S., Gurtler M., Mielke H., Linnebur M. and Fehlhaber K. Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains within multiple pig farms // *Vet Microbiol.* – №108. – P. 251-261.
15. Salihu M.D., Abdulkadir J.U., Oboegbulem S.I., Egbu G.O., Magaji A.A., Lawal M., Hassan Y. Isolation and prevalence of *Campylobacter* species in cattle from Sokoto state, Nigeria // *Veterinaria Italiana.* – 2009. – Vol. 45. – P. 501-505.
16. Powell L.F., Lawes J.R., Clifton-Hadley F.A., Rodgers J., Harris K., Evans S.J., Vidal A. The prevalence of *Campylobacter* spp. in broiler flocks and on broiler carcasses, and the risks associated with highly contaminated carcasses // *Epidemiol Infect.* – 2012. – №140(12). – P. 2233-2246.
17. European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009 // *EFSA Journal.* – 2011. – №9(3). – P. 2090.
18. World Health Organization, «*Campylobacter* Fact Sheet». – 2011.
19. Keener K.M., Bashor M.P., Curtis P.A., Sheldon B.W., Kathariou S. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing // *Compr. Rev. Food Sci.* – 2004. – Vol. 3. – P. 105-115.
20. Пожалостина Л.В. Этиологическая структура острых кишечных инфекций в России в начале XXI века // Матер. Всеросс. науч.-практ. конф. – Саратов, 2004. – С. 183-184.
21. Силина Е.А., Усачева Е.В., Пахольчук Т.М., Пахольчук О.П., Гинзбург Р.М., Родко А.С., Матвеева Т.Б. Современные клинико-терапевтические аспекты кампилобактериоза у детей // *Современная педиатрия.* – 2011. – №2. – С. 68-70.
22. Bang D.D., Pedersen K., Madsen M. Development of a PCR assay suitable for *Campylobacter* spp. mass screening programs in broiler production // *J. Rapid Meth. Automat. Microbiol.* – 2001. – Vol. 9. – P. 97-113.
23. Lund M., Wedderkopp A., Waino M., Nordentoft S., Bang D.D., Evaluation of PCR for detection of *Campylobacter* in a national broiler surveillance programme in Denmark // *J. Appl. Microbiol.* – 2003. – Vol. 94. – P. 929-935.
24. Германская коллекция микроорганизмов и клеточных культур // <http://www.dsmz.de>. – 2013.
25. Meric G., Yahara K., Mageiros L., Pascoe B., Maiden M.C., Jolley K.A., Sheppard S.K. A reference pan-genome approach to comparative bacterial genomics: identification of novel epidemiological markers in pathogenic *Campylobacter* // *PLoS One.* – 2014. – №9(3). – P. 27.
26. Roux K.H. Cold Optimization and troubleshooting in PCR // in *Spring Harbor protocols.* – New York: Spring, 2009. – P. 380.
27. Chen X.Q., Zhang X.D., Liang R.Q., Cao M.Q. Betaine improves LA-PCR amplification // *Chinese journal of biotechnology.* – 2004. – Vol. 20. – P. 715-718.
28. Chevet E., Lemaître G., Katinka M.D. Low concentrations of tetramethylammonium chloride increase yield and specificity of PCR // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – Vol. 23. – P. 3343-3344.
29. Hodges E., Boddy S.M., Thomas S., Smith J.L. Modification of IgH PCR clonal analysis by the addition of sucrose and cresol red directly to PCR reaction mixes // *Mol Pathol.* – 1997. – Vol. 50. – P. 164-166.

## REFERENCES

1. Blaser M.J., Newell D.G., Thompson S.A., Zechner E.L. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. *Campylobacter* Washington DC, 2008, pp. 401-428.
2. Campero C.M., Anderson M.L., Walker R.L., Blanchard P.C., BarBano L., Chiu P., Martinez A., Combessies G., Bardon J.C., Cordeviola J., Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions. *J Vet Med*, 2005, no. 53(3), pp. 138-141.
3. Smibert R.M. The genus *Campylobacter*. *Annu Rev Microbiol*, 1978, no. 32, pp. 673-709.
4. Zhao H., Liu H., Du Y., Liu S., Ni H., Wang Y., Wang C., Si W., Yang J., Ling J. Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Campylobacter fetus* in cattle. *Res. Vet. Sci*, 2010, vol. 88, pp. 446-451.
5. Agerholm J.S., Aalbaek B., Fog-Larsen A.M., Boye M., Holm E., Jensen T.K., Lindhardt T., Larsen L.E., Buxton D. Veterinary and medical aspects of abortion in Danish sheep. *APMIS*, 2006, vol. 114, pp. 146-152.
6. Mannering S.A., West D.M., Fenwick S.G., Marchant R.M. & O'Connell K. Pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* sheep abortion isolates. *Vet Microbiol*, 2006, vol. 115, pp. 237-242.
7. Blaser M.J. *Campylobacter fetus*-emerging infection and model system for bacterial pathogenesis at mucosal surfaces. *Clin Infect Dis*, 1998, no. 2, pp. 256-258.
8. Ichiyama S., Hirai S., Minami T., Nishiyama Y., Shimizu S., Shimokata K., Ohta M. *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* cellulitis associated with bacteremia in debilitated hosts. *Clin Infect Dis.*, 1998, no. 2, pp. 252-255.
9. Rennie R.P., Strong D., Taylor D.E., Salama S.M., Davidson C., Tabor H. *Campylobacter fetus* diarrhea in a Hutterite colony: epidemiological observations and typing of the causative organism. *J Clin Microbiol.*, 1994, no. 232, pp. 721-724.
10. Sprenger H., Zechner E.L., Gorkiewicz G. So close and yet so far - Molecular Microbiology of *Campylobacter fetus* subspecies. *Eur J Microbiol Immunol* (Bp), 2012, no. 2, pp. 66-75. doi: 10.1556/EuJMI.2.2012.1.10. Epub 2012 Mar 17.
11. Açık M.N., Cetinkaya B. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy cattle and sheep. *J Med Microbiol.*, 2006, no. 55, pp. 331-334.
12. Stanley K. and Jones K. Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *J Appl Microbiol.*, 2003, no. 94, pp. 104-113.
13. Oporto B., Esteban J.I., Aduriz G., Juste R.A. and Hurtado A. Prevalence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle, sheep and swine farms. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, no. 103, pp. 977-984.
14. Alter T., Gaull F., Kasimir S., Gurtler M., Mielke H., Linnebur M. and Fehlhaber K. Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains within multiple pig farms. *Vet Microbiol*, no. 108, pp. 251-261.
15. Salihu M.D., Abdulkadir J.U., Oboegbulem S.I., Egwu G.O., Magaji A.A., Lawal M., Hassan Y. Isolation and prevalence of *Campylobacter* species in cattle from Sokoto state, Nigeria. *Veterinaria Italiana*, 2009, vol. 45, pp. 501-505.
16. Powell L.F., Lawes J.R., Clifton-Hadley F.A., Rodgers J., Harris K., Evans S.J., Vidal A. The prevalence of *Campylobacter* spp. in broiler flocks and on broiler carcasses, and the risks associated with highly contaminated carcasses. *Epidemiol Infect.*, 2012, no. 140(12), pp. 2233-2246.
17. European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal*, 2011, no. 9(3), pp. 2090.
18. World Health Organization, «*Campylobacter* Fact Sheet», 2011.

19. Keener K.M., Bashor M.P., Curtis P.A., Sheldon B.W., Kathariou S. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Compr. Rev. Food Sci.*, 2004, vol. 3, pp. 105-115.
20. Pozhalostina L.V. Jetiologicheskaja struktura ostryh kishechnyh infekcij v Rossii v nachale XXI veka [The etiological structure of acute intestinal infections in Russia at the beginning of the XXI century]. Mater. Vseross. nauch.-prakt. konf. [Proc. Russ. Sci. conf.]. Saratov, 2004, pp.183-184.
21. Silina E.A., Usacheva E.V., Pahol'chuk T.M., Pahol'chuk O.P., Ginzburg R.M., Rodko A.S., Matveeva T.B. Sovremennye kliniko terapevticheskie aspekty kampilobakterioza u detej [Modern clinical and therapeutic aspects of campylobacteriosis in children]. *Sovremennaja pediatrija – Modern pediatric*, 2011, no. 2, pp. 68-70.
22. Bang D.D., Pedersen K., Madsen M. Development of a PCR assay suitable for *Campylobacter* spp. mass screening programs in broiler production. *J. Rapid Meth. Automat. Microbiol.*, 2001, vol. 9, pp. 97-113.
23. Lund M., Wedderkopp A., Waino M., Nordentoft S., Bang D.D., Evaluation of PCR for detection of *Campylobacter* in a national broiler surveillance programme in Denmark. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, vol. 94, pp. 929-935.
24. Germanskoj kollekcii mikroorganizmov i kletocnyh kul'tur : <http://www.dsmz.de>. - 2013.
25. MERIC G., YAHARA K., MAGEIROS L., PASCOE B., MAIDEN M.C., JOLLEY K.A., SHEPPARD S.K. A reference pan-genome approach to comparative bacterial genomics: identification of novel epidemiological markers in pathogenic *Campylobacter*. *PLoS One*, 2014, no. 9(3), pp. 27.
26. Roux K.H. Cold Optimization and troubleshooting in PCR. New York: Spring, 2009, pp. 380.
27. Chen X.Q., Zhang X.D., Liang R.Q., Cao M.Q. Betaine improves LA-PCR amplification. *Chinese journal of biotechnology*, 2004, vol. 20, pp. 715-718.
28. Chevet E., Lemaître G., Katinka M.D. Low concentrations of tetramethylammonium chloride increase yield and specificity of PCR. *Nucleic Acids Res.*, 1995, vol. 23, pp. 3343-3344.
29. Hodges E., Boddy S.M., Thomas S., Smith J.L. Modification of IgH PCR clonal analysis by the addition of sucrose and cresol red directly to PCR reaction mixes. *Mol Pathol.*, 1997, vol. 50, pp. 164-166.

## ТҮЙІН

Кампилобактериоз диагностикасының бактериологиялық әдістерінің тиімділігінің төмендігі кампилобактериялардың клиникалық маңызды түрлерін анықтау үшін ПТР тестерін әзірлеу мен енгізудің келешегі бар екендігін көрсетеді. Осы жұмыстың мақсаты клиникалық материалдар мен мал шаруашылығы өнімдеріндегі *C. coli*, *C. jejuni* және *C. fetus*-ті анықтау мен түр-тұқымдық саралауға арналған тиімділігі жоғары ПТР тестерін әзірлеу болып табылады.

ДНҚ-ның екі рет ерітілген үлгілеріне жүргізілген сезімталдықты бағалау *C. coli* және *C. fetus* үшін 108 геномдық эквивалентті және *C. jejuni* үшін 13,7 геномдық эквивалентті сезімталдықтың аналитикалық шегін анықтауға мүмкіндік берді. ПТР тестінің ерекшелігін бағалау кампилобактериялардың 10 түрінің ДНҚ-сының, *H. pylori* генетикалық жақын түрінің ДНҚ-сының, сонымен қатар жануарлар мен адамда инфекциялық ауру тудыратын бактериялардың ДНҚ-сына ұқсас тестің жоғары ерекшелігін дәлелдеді.

Жоғары аналитикалық сезімталдық пен ерекшелік әзірленген тесті кампилобактериоздың экспресс диагностикасында қолдануға, сонымен қатар мал шаруашылығының *C.coli*, *C. fetus* және *C. jejuni* өнімдерінің ластануына анализ жүргізуге мүмкіндік береді.

**Кілтті сөздер:** кампилобактериялар, ПТР, диагностика, ерекшелік, сезімталдық, *Campylobacter. jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*.

Биотехнология. Теория и практика. 2014, №3, стр. 54-60

DOI: 10.11134/btp.3.2014.8