

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018
УДК 614.31:579.835.12]-078

Шевелёва С.А., Ефимочкина Н.Р., Пичугина Т.В., Быкова И.Б., Стеценко В.В., Маркова Ю.М., Минаева Л.П.

УСКОРЕННЫЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *CAMPYLOBACTER* В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 109240, Москва

Введение. Кампилобактериоз – острое кишечное заболевание, вызываемое бактериями рода *Campylobacter*, которое протекает с симптомами энтероколита и гастроэнтерита. В группу возбудителей кампилобактериоза входят термофильные виды *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* и *C. helveticus*. Заболеваемость кампилобактериозом регистрируется повсеместно в виде спорадических случаев, эпидемических очагов с пищевым и водным путями передачи инфекции. Индустриализация производства птицепродуктов привела к ускорению эволюции комменсальных для птицы патогенов рода *Campylobacter*, усилению контаминации ими продукции и повышению значимости в качестве возбудителей кампилобактериоза с пищевым путём передачи.

Материал и методы. Основными объектами исследований являлись сырые птицепродукты и смывы с объектов производственной среды птицеперерабатывающих предприятий. Использованы культуральные, биохимические, иммунологические методы, методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, ПЦР-анализ.

Результаты и обсуждение. Разработаны методы ускоренной индикации термофильных кампилобактеров в пищевой продукции и в смывах с объектов производственной среды с использованием комбинированных схем бактериологического и молекулярно-генетического анализа. Поскольку бактерии вида *C. jejuni* составляют 85–90% пищевых изолятов кампилобактеров, для целей производственного контроля допускается проведение анализа на наличие термофильных представителей рода *Campylobacter* с применением минимального набора культуральных и биохимических тестов родовой идентификации, что позволит сократить продолжительность анализов на 3–4 сут. в сравнении со стандартизованными методами, и снизить их трудоёмкость. Определены контрольные критические точки производства птицепродуктов, в которых необходимо проведение контроля на наличие термофильных кампилобактеров. Анализ смывов с поверхностью должен осуществляться на этапах убой, ошпаривания, мойки и обработки на конвейере тушек, в ваннах контактного охлаждения, на участках изготовления полуфабрикатов и в процессе упаковки продукции.

Заключение. Полученные результаты использованы для разработки Методических указаний «Методы ускоренного определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевой продукции и оценка их антибиотикорезистентности».

Ключевые слова: бактерии рода *Campylobacter*; пищевые продукты; смывы; методы детекции; тесты идентификации.

Для цитирования: Шевелёва С.А., Ефимочкина Н.Р., Пичугина Т.В., Быкова И.Б., Стеценко В.В., Маркова Ю.М., Минаева Л.П. Ускоренные методы обнаружения бактерий рода *Campylobacter* в пищевых продуктах. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(10): 995-1000. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-10-995-1000>

Для корреспонденции: Ефимочкина Наталья Рамазановна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биобезопасности и анализа нутримикробиома ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». E-mail: karlikanova@ion.ru

Sheveleva S.A., Efimochkina N.R., Pichugina T.V., Bykova I.B., Stetsenko V.V., Markova Yu.M., Minaeva L.P.

RAPID METHODS OF THE DETECTION OF BACTERIA OF THE GENUS *CAMPYLOBACTER* IN FOOD PRODUCTS

Federal Research Center of nutrition, biotechnologies and food safety, Moscow, 109240, Russian Federation

Introduction. *Campylobacteriosis* is an acute intestinal disease caused by *Campylobacter* spp., which manifests with symptoms of enterocolitis and gastroenteritis. The causative agents of campylobacteriosis are *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. helveticus*. The incidence of campylobacteriosis is recorded worldwide as sporadic cases and foodborne or waterborne outbreaks. The industrialization of poultry production has led both to the acceleration of the evolution of commensal pathogens from the genus of *Campylobacter*, increased contamination of raw products and importance *Campylobacter* as foodborne pathogens.

Material and methods. The main objects were raw poultry products and swabs from the environment of poultry processing enterprises. Cultural, biochemical, immunological methods, methods for the detection of the sensitivity of microorganisms to antibiotics, PCR analysis were used. Results and discussion. The methods of rapid detection of thermophilic campylobacters using combined schemes of bacteriological and molecular genetic analysis are developed. Because *C. jejuni* makes 85–90% of food isolates of campylobacters, for the purposes of production control the detection of thermophilic *Campylobacter* with a minimum set of cultural and biochemical tests of identification is allowed. This will reduce the duration of analyses up to 3–4 days and decrease their labor-cost. The control critical points of production of poultry products in which it is necessary to control the presence of thermophilic campylobacters are indicated. These are the stages of slaughter, scalding, washing, and processing on the conveyor of carcasses, contact cooling baths, the areas of semi-finished products manufacturing and the packaging.

Conclusion. The obtained results were used to develop Guidelines “Methods of rapid determination of bacteria of the genus *Campylobacter* in food products and evaluation of their antibiotic resistance”.

Key words: bacteria of the genus *Campylobacter*; food products; swabs; detection methods; identification tests.

For citation: Sheveleva S. A., Efimochkina N. R., Pichugina T. V., Bykova I. B., Stetsenko V. V., Markova Yu. M., Minaeva L. P. Rapid methods of the detection of bacteria of the genus *Campylobacter* in food products. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2018; 97(10): 995-1000. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-10-995-1000>

For correspondence: Natalya R. Efimochkina, MD, Ph.D., DSci., Leading researcher of the laboratory of biosafety and nutrimeicrobiome analysis of the Federal Research Centre of nutrition, biotechnology and food safety, Moscow, 109240, Russian Federation. E-mail: karlikanova@ion.ru

Information about authors: Sheveleva S.A. <https://orcid.org/0000-0001-5647-9709>;

Efimochkina N.R. <http://orcid.org/0000-0002-9071-0326>; Pichugina T. V. <http://orcid.org/0000-0002-4632-7119>;

Bykova I.B. <https://orcid.org/0000-0001-7288-312X>; Stetsenko V.V. <http://orcid.org/0000-0001-6470-171X>;

Markova Yu. M. <http://orcid.org/0000-0002-2631-6412>; Minaeva L.P. <http://orcid.org/0000-0003-1853-5735>.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation (project No. 15-16-00015-P).

Received: 20 August 2018

Accepted: 18 October 2018

Введение

Гастроэнтероколиты, вызванные бактериями рода *Campylobacter*, в настоящее время сохраняют лидирующие позиции среди острых кишечных инфекций с пищевым путём передачи. По данным ВОЗ, кампилобактериозные инфекции составляют 21% от общего числа диарейных инфекций вирусной и бактериальной этиологии. В Европейском Союзе в 2016 году число подтвержденных случаев этой инфекции в 2,2 раза превысило число случаев сальмонеллёза, а заболеваемость составила 72,4 на 100 000 населения. По оценкам CDC (Centers for Disease Control and Prevention), кампилобактериозом в США страдает более 1,3 млн человек ежегодно [1, 2]. Кампилобактериозный гастроэнтерит у чувствительных лиц в результате патологического аутоиммунного ответа может осложниться развитием хронической патологии: синдрома раздражённого кишечника, реактивных артритов, нейропатий и полирадикулоневритов (синдромов Гийена – Баре и Миллера – Фишера), что резко повышает социальную значимость заболевания [3–6]. Заболеваемость кампилобактериозом преимущественно имеет спорадический характер, однако вспышки с пищевым и водным путями передачи инфекции регистрируются достаточно часто в большинстве стран Европы, в США, Новой Зеландии, Австралии [7–9].

Анализ эпидемиологической ситуации в Российской Федерации, несмотря на некоторое увеличение регистрации случаев кампилобактериоза, свидетельствует о неудовлетворительном состоянии этиологической диагностики, сложностях при обосновании причинно-следственных связей с факторами распространения возбудителя.

Развитие птицеперерабатывающей отрасли пищевой индустрии по темпам роста и объемам продукции превосходит развитие других отраслей животноводства как в России, так и в большинстве стран мира. Индустриализация производства мяса птицы и птицепродуктов в глобальном масштабе привела к ускорению эволюции комменсальных для птицы патогенов рода *Campylobacter*, усилению контаминации ими продукции и повышению значимости в качестве возбудителей острых кишечных инфекций с пищевым путём передачи.

Система мер по предупреждению и минимизации риска загрязнения пищевых продуктов кампилобактерами в процессе производства, хранения, транспортирования и реализации продукции регламентирована действующими в Российской Федерации Санитарными правилами СП 3.1.7.2816–10 «Профилактика кампилобактериоза у людей». При этом предусматривается проведение производственного контроля по всем эпидемиологически значимым объектам и в критических точках потенциальной контаминации возбудителями кампилобактериоза.

При выполнении СП 3.1.7.2816–10 требуется совершенствование существующей методической базы по обнаружению возбудителя кампилобактериоза, включая применение международных (ISO) или межгосударственных стандартов (ГОСТ) и их адаптацию к отечественным условиям лабораторного контроля сырья, полуфабрикатов, готовой продукции, а также объектов производственной среды.

В группу термофильных бактерий рода *Campylobacter* – возбудителей кампилобактериоза – входят виды *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* и *C. helveticus*. Наибольшую эпидемиологическую значимость представляют *C. jejuni*, которые обуславливают основную часть (85–90%) случаев кампилобактериоза [10–12]. Несмотря на высокую чувствительность к воздействию неблагоприятных факторов, в первую очередь к присутствию кислот, кампилобактеры регулярно обнаруживаются на фермах и птицеперерабатывающих предприятиях, в воде и других объектах, поэтому их обнаружение требует разработки новых ускоренных методов детекции.

Материал и методы

Работа выполнена в лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». Объектами исследований являлись продукты животного и растительного происхождения, смывы с объектов внешней среды птицеперерабатывающих предприятий. Всего исследовали более 300 проб, в том числе мясо, полуфабрикаты и субпродукты сырые различных видов птицы (кур, индейки, перепелов), молоко коровье непастеризованное, салаты листовые, смывы с поверхностей технологического оборудования. Микробиологические исследования пищевой продукции и смывов на наличие бактерий рода *Campylobacter* проводили с использованием как общепринятых культуральных методов посева пищевых продуктов, так и с применением вновь разрабатываемых или модифицированных способов выделения и количественного учёта возбудителей кампилобактериоза [13, 14]. При выполнении работы также использовали биохимические, иммунологические методы, стандартные и модифицированные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, методы ПЦР-анализа.

Результаты и обсуждение

Культуральные методы детекции *Campylobacter* в пищевой продукции предусматривают использование жидких и агаризованных селективных, дифференциально-диагностических сред и культивирование посевов с применением микроаэробно-генерирующих систем. Эти методы регламентированы стандартами ISO 10272:2017, ГОСТ ISO 10272-1-2013 и ГОСТ ISO/TS 10272-2-2013 [13–15].

Процедура выделения *Campylobacter* из образцов пищевых продуктов является длительной и трудоёмкой: для подтверждения принадлежности выделенных культур к роду *Campylobacter* и видовой идентификации требуется не менее 7–10 суток.

В лабораторной диагностике кампилобактериоза наиболее трудной задачей является первичная детекция возбудителя в связи с высокими уровнями микробного загрязнения пищевых продуктов и особенно сырья. На общем микробном фоне исследуемого субстрата количество патогенов бывает, как правило, незначительным, поэтому их прямое культивирование оказывается невозможным, в связи с чем возникает необходимость применения специальных селективных методов обогащения для выделения и идентификации возбудителя. Для селективного выделения кампилобактерий используется широкий перечень питательных сред, ингибирующих агентов и тестов идентификации, учитывающих наиболее характерные культурально-морфологические и биохимические свойства возбудителя [16, 17]. Способность кампилобактерий переходить под влиянием стрессовых воздействий в некультивируемые формы создаёт особенно трудные методические проблемы для получения объективной оценки степени контаминации продукции и адекватного прогнозирования пригодности используемых схем контроля.

Проведённые скрининговые исследования по выделению кампилобактерий из продуктов, полуфабрикатов и объектов внешней среды позволили разработать и рекомендовать для внедрения схему ускоренного определения термофильных бактерий рода *Campylobacter* (рис. 1). Схема допускает использование следующих трёх вариантов детекции *Campylobacter*:

- качественный и количественный бактериологический анализ с идентификацией до рода;
- фермент-связанный флуоресцентный иммуноанализ недифференцированного суммарного определения видов *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*;
- анализ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализ) с гибридно-флуоресцентной детекцией.

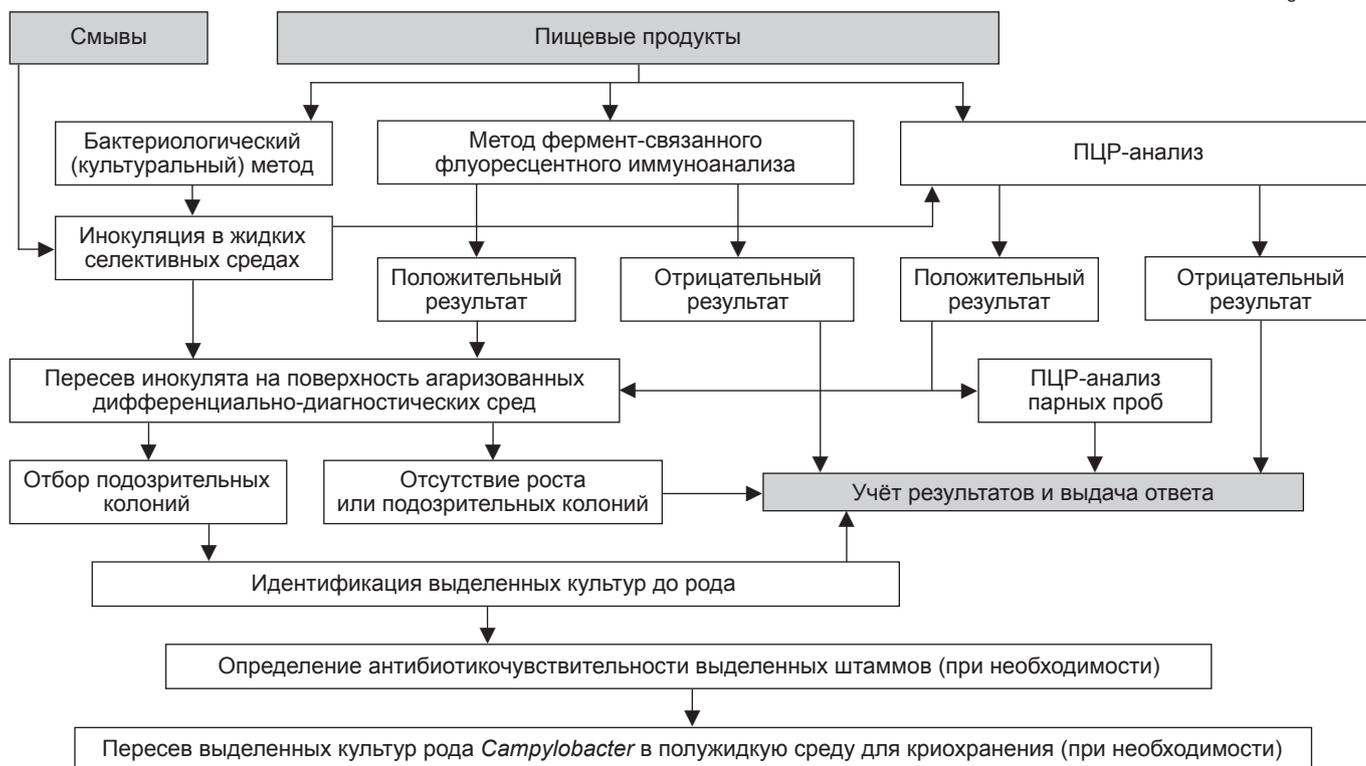


Рис. 1. Схема проведения анализа на наличие бактерий рода *Campylobacter* в пищевых продуктах и смывах.

Учитывая, что кампилобактерии очень чувствительны к воздействию физико-химических параметров внешней среды, таких как присутствие кислорода (окислительный стресс), замораживание, нагревание, высушивание, окислительно-восстановительный потенциал среды, ультрафиолетовое облучение [18–20], большое методическое значение приобретает процедура отбора и предподготовки проб к исследованию на наличие бактерий рода *Campylobacter*. В связи с этим рекомендуется:

- отбор проб и их доставку в лабораторию для исследования проводить в максимально короткие сроки, по возможности не более 1 ч; пробы должны отбираться в стерильные газонепроницаемые пакеты или герметично закрывающуюся стерильную посуду;
- транспортировка проб в термомониторах или сумках-холодильниках;
- сохранять пробы до проведения анализа в защищённом от света месте при температуре $5 \pm 1^\circ\text{C}$; образцы замороженных продуктов дефростировать при температуре $5 \pm 1^\circ\text{C}$ не более 18 ч или в течение 1 ч при температуре $19 \pm 1^\circ\text{C}$;
- после вскрытия упаковки пробы немедленно подвергать анализу; приготовление объединённой пробы, навесок продукта и посев осуществлять в максимально короткие сроки (не более 1 ч); для приготовления объединённой пробы продукт измельчают, не допуская активного перемешивания образца во избежание воздействия кислорода.

Придавая особое значение технике отбора и тестирования смывов с поверхностей оборудования и объектов внешней среды на наличие бактерий рода *Campylobacter*, разработана модифицированная методика, основанная на комплексном применении трёх видов сред для транспортирования и накопления кампилобактеров. Пробы в исследуемой зоне отбирают трижды зонд-тампонами (с участков площадью 100 см^2 для каждого тампона), и вносят в три среды: бульон Престона с кровью, бульон для бруцелл и транспортную среду Кэри-Блера с последующими пересевами на поверхность агаровых дифференциально-диагностических сред. Инокулированные смывы доставляют в лабораторию в герметично упакованных пакетах с газогенераторными системами и подвергают термостатированию, не нарушая целостности транспортной упаковки. Результаты посевов из трёх жидких сред оценивают положительно при наличии роста *Campylobacter* хотя бы в одной из засеянных сред.

Эффективность разработанной комбинированной методики отбора проб с использованием не менее трёх вариантов транспортных сред была подтверждена исследованиями смывов на наличие бактерий рода *Campylobacter* в условиях пищевого предприятия [21]. При установленной частоте выявления *Campylobacter* в количестве 38,7% открываемость проб в трёх вариантах сред различалась: в бульоне

для бруцелл и в среде Кэри-Блера она была примерно равной и составляла 19,4%, а в бульоне Престона – 9,7% положительных проб. При этом в большинстве случаев выявленные положительные пробы не дублировались одновременно на всех использованных средах.

Анализ результатов скрининговых исследований характера контаминации производственной среды предприятий птицеперерабатывающей промышленности позволил разработать и рекомендовать схему и порядок взятия смывов. Ориентировочная частота проведения анализа смывов на наличие кампилобактерий для оценки санитарного состояния конкретного предприятия представлена в табл. 1.

Отбор смывов производится после санитарной обработки, перед началом работы оборудования. При обнаружении бактерий рода *Campylobacter* в смывах кратность контроля на соответствующем участке увеличивают в 2 раза. При обнаружении термофильных кампилобактерий в смывах с технологического оборудования, инвентаря убойных, яйцеобрабатывающих цехов проводят внеочередную тщательную механическую и санитарную обработку, дезинфекцию оборудования, включая холодильные камеры. При последующем контроле за проведенными мероприятиями термофильные кампилобактерии в смывах не должны обнаруживаться.

Модифицированный культуральный метод определения бактерий рода *Campylobacter* предусматривает посев определённых количеств исследуемой пробы в жидкие селективные среды, содержащие антибиотики и азотолерантные добавки, с последующим пересевом на поверхность агаризованных селективных сред и инкубированием в микроаэрофильной атмосфере ($10\% \text{ CO}_2$, $5\% \text{ O}_2$, $85\% \text{ N}_2$) при температуре $37\text{--}42^\circ\text{C}$. Выросшие на поверхности селективного агара типичные колонии подвергают идентификации, тестируя их по совокупности культуральных, морфологических и биохимических признаков, определяющих принадлежность к бактериям рода *Campylobacter*. Все этапы инкубации посевов осуществляются в микроаэрофильных условиях.

Кампилобактерии на поверхности агара образуют мелкие округлые колонии или колонии неправильной формы, как бы растекающиеся по ходу штриха, серые или полупрозрачные с сероватым оттенком, гладкие, влажные, блестящие. Выросшие культуры окрашивают по Граму и микроскопируют, определяют наличие оксидазы и каталазы.

При обнаружении роста на агаровой селективной среде колоний с типичными культуральными свойствами, в которых обнаруживаются грамотрицательные мелкие, тонкие спиралевидные палочки с одним или более завитками, обладающие ферментами каталазой и оксидазой, делают вывод об обнаружении термофильных бактерий рода *Campylobacter*. В качестве дополнительного подтверждающего теста допускается ис-

Рекомендуемый порядок взятия смывов на предприятиях птицеперерабатывающей промышленности

	Объект контроля	Кратность контроля
Цеха убоя, первичной переработки мяса и птицы:	Крупное оборудование, включая конвейеры, поверхности столов, ванны охлаждения	Не реже 1 раза в 2 недели, не менее пяти проб
	Мелкое оборудование и инвентарь (выборочно, с чередованием единиц оборудования)	Не реже 1 раза в 2 недели, не менее пяти проб
Цеха производства сырых полуфабрикатов из мяса и птицы	Крупное оборудование	Не реже 1 раза в месяц, не менее трёх проб
	Мелкое оборудование и инвентарь (выборочно, с чередованием единиц оборудования),	Не реже двух раз в месяц, не менее трёх проб
Цеха упаковки	Тара, упаковочное оборудование, поверхности, контактирующие с продукцией	Не реже двух раз в квартал, не менее трёх проб
Руки персонала, одежда	у работников, соприкасающихся с продукцией, в середине и в конце смены	Не реже 2 раз в квартал, не менее пяти проб

пользовать иммунохроматографические тесты промышленного изготовления для детекции *Campylobacter spp.*

Основным отличием предлагаемого метода является сокращение в два раза продолжительности селективного обогащения в жидкой среде и культивирования на агаровых средах (до 24 ч вместо 48 ч по ГОСТ 10272), а также подбор минимального комплекса информативных тестов для первичной родовой идентификации, позволяющих определить принадлежность выделенных культур к группе термотолерантных кампилобактеров (микроскопия по Граму, наличие ферментов оксидазы и каталазы). Применение предлагаемого модифицированного метода позволяет не только сократить время анализа, но и снизить трудоёмкость лабораторных исследований. Кроме того, за счёт сокращения времени инкубации удаётся предотвратить рост сопутствующей микрофлоры (особенно протей), что повышает открываемость проб и достоверность получаемых результатов.

С целью повышения эффективности выделения бактерий рода *Campylobacter* из различных объектов были модифицированы рецептуры традиционно используемых питательных сред и подобран сбалансированный состав ростовых и селективных компонентов в соответствии с требованиями ГОСТ ISO 10272-1-2013 и МУК 4.2.2321-08 [22]. Учитывая актуальность стандартизации методов контроля бактерий рода *Campylobacter* и отсутствие в Российской Федерации необходимого набора отечественных аналогов питательных сред разработан оптимизированный способ производства сухих питательных сред для выявления, идентификации и хранения кампилобактерий, выделенных из пищевой продукции и клинического материала [23]. Проведённые исследования позволили разработать ТУ 21.20.23-006-01897222-2016 «Питательные среды для детекции бактерий рода *Campylobacter*» и «Инструкцию по применению питательных сред». В зависимости от назначения среды вырабатывают в следующих вариантах: жидкая селективная среда для накопления кампилобактерий; дифференциально-диагностический агар для выделения и количественного учёта *Campylobacter spp.* (ДДА *Campy*); полужидкий питательный агар для криохранения культур *Campylobacter spp.* Практическое применение этих сред в условиях отечественных лабораторий позволит существенно упростить использование действующих ГОСТов, разработанных на основе международных стандартов ISO, но не адаптированных к основному ассортименту коммерческих сред и реактивов, применяемых при рутинном контроле пищевых продуктов на наличие кампилобактерий.

Таблица 2

Критерии оценки чувствительности *Campylobacter spp.* к АМП

АМП	Диаметр зоны, мм		Порог чувствительности, мг/л	Диапазон тестируемых концентраций, мг/л
	S ≥	R <		
Ципрофлоксацин	26	25	0,5	0,12–16
Эритромицин	20	19	4–8	1–28
Налидиксовая кислота	20	19	16	1–64
Тетрациклин	30	30	1-2	0,5–64
Гентамицин	17	16	2	0,12–16
Доксициклин	30	30	–	–
Хлорамфеникол	17	17	–	–
Амикацин	18	16	–	–

Примечание. S – чувствительные штаммы; R – резистентные штаммы.

Метод фермент-связанного флуоресцентного иммуноанализа.

Для детекции микроорганизмов или их белковых метаболитов разработано большое число методов иммуноферментного анализа (ИФА). Диагностические препараты для ИФА, предназначенные для выявления большинства серологических маркеров, выпускаются различными предприятиями и фирмами как у нас в стране, так и за рубежом. Одним из наиболее важных вопросов при их выборе является вопрос чувствительности метода и специфичности получаемых результатов, что достигается стандартизацией и адаптацией предлагаемых методик. С целью ускорения и снижения трудоёмкости исследований на наличие термобактерий *Campylobacter spp.* для контроля пищевых продуктов подобран альтернативный метод фермент-связанного флуоресцентного иммуноанализа [24].

Для фермент-связанного флуоресцентного иммуноанализа используют автоматические анализаторы, позволяющие проводить измерение флуоресценции 4-метил-умбеллиферона при 450 нм, а также тест-наборы, в состав которых входят сенсibilизированные антителами пипетирующие устройства и реагенты для проведения анализа. О результатах теста судят по относительной величине флуоресценции (ОВФ), значение которой для положительных проб должно быть ≥ 0,1, а для отрицательных – ≤ 0,1.

Анализ проводится после этапа предварительного обогащения проб пищевых продуктов (или смывов) в селективном бульоне с добавками антибиотиков и не требует выделения чистой культуры. При необходимости подтверждения положительного результата проводят высев 0,1 см³ инокулированного бульона обогащения, хранившегося при 2–4°C (без прогревания), на поверхность одной из селективных агаровых сред. При обнаружении подозрительных колоний проводят их идентификацию (не менее трёх колоний) на принадлежность к термобактериям рода *Campylobacter*.

Метод детекции термобактерий рода *Campylobacter* на основе ПЦР предусматривает высев определённых количеств исследуемых проб пищевых продуктов или смывов в селективные питательные среды, инкубирование посевов, экстракцию ДНК из культуральной жидкости, амплификацию участка ДНК со специфичными праймерами и постановку ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией ампликонов в режиме реального времени.

Подтверждение положительных результатов ПЦР-тестирования проводят культуральным методом или с помощью повторного ПЦР-анализа нетермостатированных парных проб по ГОСТ Р 57989–2017 или Методическим указаниям (МУ) [25, 26].

Предложенная модифицированная схема детекции *Campylobacter spp.*, основанная на применении современных культурально-бактериологических методов в комплексе с иммунологическим и молекулярно-генетическим анализом, позволяет сократить в два раза продолжительность тестирования (до 3–4 сут. вместо 7–10) за счёт упрощения процедуры идентификации выделенных культур, оптимизации режимов пробоподготовки и условий инкубирования на этапах селективного обогащения инокулированных образцов.

Результаты исследований по оптимизации состава питательных сред и адаптации методических схем анализа для выявления и идентификации бактерий рода *Campylobacter* включены в МУ «Методы ускоренного определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевой продукции и оценка их антибиотикорезистентности» (2018 г.).

Разработанные МУ также включают оценку чувствительности к антибиотикам термобактерий рода *Campylobacter*, выделенных из пищевой продукции и смывов с объектов окружающей среды предприятий птицеперерабатывающей промышленности. Для этих целей предлагается использование дискодиффузионного метода, основанного на ингибировании роста испытуемых культур в присутствии различных антимикробных препаратов (АМП). Перечень АМП для тестирования штаммов кампилобактерий и сведения о пограничных значениях зон подавления роста представлены в табл. 2.



Рис. 2. Определение антибиотикорезистентности *Campylobacter* spp. дискодиффузионным методом.

При обнаружении резистентности исследуемого штамма кампилобактерий к одному или нескольким АМП дискодиффузионным методом (рис. 2), определяют минимальные ингибирующие концентрации (МИК) к соответствующим препаратам методом серийных разведений в соответствии с EUCAST, ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010 и МУК 4.2.1890-04 [27–29]. Сведения о пограничных значениях зон подавления роста и диапазонах тестируемых концентраций АМП обоснованы результатами исследований по оценке чувствительности к расширенному набору антимикробных препаратов нескольких фармгрупп у штаммов *Campylobacter* spp., выделенных в процессе производства пищевых продуктов [30].

Полученные данные используют для целей мониторинга и наблюдения за циркуляцией антибиотикорезистентных неклинических штаммов бактерий рода *Campylobacter*, в том числе при проведении профилактических мероприятий в соответствии с СП 3.1.7. 2816-10 «Профилактика кампилобактериоза у людей».

Заключение

Разработана комплексная методика ускоренного выявления термофильных кампилобактеров в пищевой продукции и в смывах с объектов производственной среды с использованием комбинированных схем бактериологического, иммунологического и молекулярно-генетического анализа. Применение этих схем позволяет сократить время детекции на 3–4 сут. в сравнении со стандартизованными методами анализа на наличие бактерий рода *Campylobacter*.

Результаты проведенных исследований использованы для разработки МУ «Методы ускоренного определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевой продукции и оценка их антибиотикорезистентности». Документ содержит адаптированные для целей производственного контроля ускоренные методы детекции и количественного учёта термофильных кампилобактеров на основе бактериологических, иммунофлуоресцентных и молекулярных методов анализа, порядок санитарного обследования птицеперерабатывающих предприятий в контрольных критических точках производства, рекомендации по оценке эффективности санитарной обработки оборудования и инвентаря, а также методы определения антибиотикочувствительности выделенных штаммов *Campylobacter* spp. для целей мониторинга антибиотикорезистентных возбудителей кампилобактериоза и разработки мер ограничения их циркуляции.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 15-16-00015-П).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- Ray B., Bhunia A. Fundamental Food Microbiology. Fourth Edition. CRC Press, 2008, 492 p.
- Sheppard S.K., Falush D. A candidate hopeful monster in the genus *Campylobacter*. In: *Campylobacter Ecology and Evolution*, ed. Sheppard S.K., 2014, Caister Academic Press, Norfolk, UK. 359 p., ISBN: 978-1-908230-2
- Dasti J.I., Tareen A.M., Lugert R., Zautner A.T., Gross U. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediated mechanisms. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010; 3: 205–211.
- Nachamkin I., Guerry P. *Campylobacter* infections. Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology. Wymondham, 2005: 285–293.
- Nachamkin I. Chronic effects of *Campylobacter* infections. *Microbes Infect.*, 2002; 4: 399.
- Nachamkin I., Allos B.M., Ho T. *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11: 555–567.
- World Health Organization. The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9–11 July 2012. ISBN 978 92 4 156460 1. - www.who.int.
- Nohra A., Grinberg A., Midwinter A.C., Marshall J.C., Collins-Emerson J.M., French N.P. Molecular Epidemiology of *Campylobacter coli* Strains Isolated from Different Sources in New Zealand between 2005 and 2014. *Appl. and Environ. Microbiol.* 2016; 82 (14): 4363–4370.
- Van Dyke M.I., Morton V.K., McLellan N.L., Huck P.M. The occurrence of *Campylobacter* in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 109: 1053–1066. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04730.x>.
- Eurosurveillance Editorial Team. 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *Euro Surveill.* 17:20113. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20113>
- Mullner P., Spencer S.E., Wilson D.J., Jones G., Noble A.D., Midwinter A.C., Collins-Emerson J.M., Carter P., Hathaway S., French N.P. Assigning the source of human campylobacteriosis in New Zealand: a comparative genetic and epidemiological approach. *Infect. Genet. Evol.* 2009; 9: 1311–1319. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.09.003>.
- Campylobacter Ecology and Evolution*. 2014, Caister Academic Press, Norfolk, UK, Ed. S.K. Sheppard. 359 p., ISBN: 978-1-908230-2.
- ГОСТ ISO 10272-1-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы обнаружения и подсчета бактерий *Campylobacter* spp. Часть 1. Метод обнаружения
- ГОСТ ISO/TS 10272-2-2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы обнаружения и подсчета бактерий *Campylobacter* spp. Часть 2. Метод подсчета колоний
- ISO 10272:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method.
- Bolton F.J., Sails A.D., Fox A.J. et al. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Foods by Enrichment Culture and Polymerase Chain Reaction Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Food Protection*, 2002; 65 (5): 760–767.
- Berghaus R.D., Thayer S.G., Law B.F., Mild R.M., Hofacre C.L., Singer R.S. Enumeration of Salmonella and *Campylobacter* spp. in environmental farm samples and processing plant carcass rinses from commercial broiler chicken flocks. *Appl. and Environ. Microbiology.* 2013; 79 (13): 4106–4114.
- Seinige D., Krischek C., Klein G., Kehrenberg C. Comparative Analysis and Limitations of Ethidium Monoazide and Propidium Monoazide Treatments for the Differentiation of Viable and Nonviable *Campylobacter* Cells. *Appl. and Environ. Microbiology.* 2014; 80 (7): 2186–2192.
- Friesema I.H., Havelaar A.H., Westra P.P., Wagenaar J.A., van Pelt W. Poultry culling and campylobacteriosis reduction among humans, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18 (3): 466–468.
- Stintzi A. Gene Expression Profile of *Campylobacter jejuni* in Response to Growth Temperature Variation. *J. of Bacteriology*, 2003; 185 (6): 2009–2016.

21. Ефимочкина Н.Р., Быкова И.Б., Стеценко В.В., Минаева Л.П., Пичугина Т.В., Маркова Ю.М., Короткевич Ю.В., Козак С.С., Шевелева С.А. Изучение характера контаминации и уровней содержания бактерий рода *Campylobacter* в отдельных видах пищевой продукции. *Вопросы питания*. 2016; 85 (5): 52-59.
22. МУК 4.2.2321-08 «Методы определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевых продуктах». М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 31 с.
23. Ефимочкина Н.Р., Пичугина Т.В., Стеценко В.В., Быкова И.Б., Маркова Ю.М., Короткевич Ю.В., Полянина А.С., Шевелева С.А. Оптимизация методов контроля пищевых продуктов на основе создания дифференциально-диагностических сред для выделения и культивирования бактерий рода *Campylobacter*. *Вопросы питания*. 2017; 86 (5): 34-41.
24. МУК 4.2.2878-11 «Методы определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевых продуктах. Дополнения и изменения 1 к МУК 4.2.2321-08». М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. 8 с.
25. ГОСТ Р 57989-2017 Продукция пищевая специализированная. Методы выявления патогенных микроорганизмов на основе полимеразной цепной реакции.
26. МУК 4.2.2872-2011 «Методы выявления и идентификации патогенных бактерий - возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путём передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридационно – флуоресцентной детекцией». М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. 47 с.
27. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2014 г.
28. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, January, 2015.
29. МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». М., Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с.
30. Ефимочкина Н.Р., Короткевич Ю.В., Стеценко В.В., Пичугина Т.В., Быкова И.Б., Маркова Ю.М., Минаева Л.П., Шевелева С.А. Антибиотикорезистентность штаммов *Campylobacter jejuni*, выделенных из пищевых продуктов. *Вопросы питания*. 2017; 86 (1): 18-28.
11. Mullner P., Spencer S.E., Wilson D.J., Jones G., Noble A.D., Midwinter A.C., Collins-Emerson J.M., Carter P., Hathaway S., French N.P. Assigning the source of human campylobacteriosis in New Zealand: a comparative genetic and epidemiological approach. *Infect. Genet. Evol.* 2009; 9: 1311–1319. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.09.003>.
12. *Campylobacter Ecology and Evolution*. 2014, Caister Academic Press, Norfolk, UK, Ed. S.K. Sheppard. 359 p., ISBN: 978-1-908230-2.
13. GOST ISO 10272-1-2013. Microbiology of food and animal feed. Methods of detection and counting of bacteria *Campylobacter* spp. Part 1. Detection method.
14. GOST ISO/TS 10272-2-2013 Microbiology of food and animal feed. Methods of detection and counting of bacteria *Campylobacter* spp. Part 2. Colony count technique.
15. ISO 10272:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method.
16. Bolton F.J., Sails A.D., Fox A.J. et al. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Foods by Enrichment Culture and Polymerase Chain Reaction Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Food Protection*, 2002; 65 (5): 760-767.
17. Berghaus R.D., Thayer S.G., Law B.F., Mild R.M., Hofacre C.L., Singer R.S. Enumeration of Salmonella and *Campylobacter* spp. in environmental farm samples and processing plant carcass rinses from commercial broiler chicken flocks. *Appl. and Environ. Microbiology*. 2013; 79 (13): 4106-4114.
18. Seining D., Krischek C., Klein G., Kehrenberg C. Comparative Analysis and Limitations of Ethidium Monoazide and Propidium Monoazide Treatments for the Differentiation of Viable and Nonviable *Campylobacter* Cells. *Appl. and Environ. Microbiology*. 2014; 80 (7): 2186-2192.
19. Friesema I.H., Havelaar A.H., Westra P.P., Wagenaar J.A., van Pelt W. Poultry culling and campylobacteriosis reduction among humans, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18 (3): 466-468.
20. Stintzi A. Gene Expression Profile of *Campylobacter jejuni* in Response to Growth Temperature Variation. *J. of Bacteriology*, 2003; 185 (6): 2009–2016.
21. Ефимочкина Н.Р., Быкова И.Б., Минаева Л.П., Пичугина Т.В., Стеценко В.В., Маркова Ю.М., Короткевич Ю.В., Козак С.С., Шевелева С.А. Исследование контаминации и уровней содержания бактерий рода *Campylobacter* в отдельных видах пищевой продукции. *Вопросы питания*. 2016; 85 (5): 52-59. (In Russian).
22. Methodological guidelines 4.2.2321-08 «Methods for the determination of bacteria of the genus *Campylobacter* in food products». М., Federal center of hygiene and epidemiology of Rosпотребнадзор, 2008: 31.
23. Ефимочкина Н.Р., Пичугина Т.В., Стеценко В.В., Быкова И.Б., Маркова Ю.М., Короткевич Ю.В., Полянина А.С., Шевелева С.А. Оптимизация методов контроля пищевых продуктов на основе создания дифференциально-диагностических сред для выделения и культивирования бактерий рода *Campylobacter*. *Вопросы питания*. 2017; 86 (5): 34-41. (In Russian).
24. Methodological guidelines 4.2.2878-11 “Methods for determination of bacteria of the genus *Campylobacter* in food. Addendum and amendments 1 to methodological guidelines 4.2.2321-08”. М., Federal Center of hygiene and epidemiology of Rosпотребнадзор, 2011. 8 p.
25. GOST R 57989-2017 Specialized Food Products. Methods of detection of pathogenic microorganisms based on polymerase chain reaction.
26. Methodological guidelines 4.2.2872-2011 “Methods for detection and identification of bacterial foodborne pathogens in the food products based on PCR with fluorescence detection”. М., Federal Center of hygiene and epidemiology of Rosпотребнадзор, 2011. 47 p.
27. Clinical guidelines “Determination of microbial susceptibility to antimicrobial agents”, 2014.
28. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, January, 2015.
29. Methodological guidelines 4.2.1890-04 “Determination of sensitivity of microorganisms to antibiotics”. М., Federal Center of Gossanepidnadzor of the Ministry of health of Russia, 2004. 91 p.
30. Ефимочкина Н.Р., Короткевич Ю.В., Стеценко В.В., Пичугина Т.В., Быкова И.Б., Маркова Ю.М., Минаева Л.П., Шевелева С.А. Антибиотикорезистентность штаммов *Campylobacter jejuni* изолированных из пищевых продуктов. *Вопросы питания*, 2017; 86 (1): 18-28. (In Russian).

References

1. Ray B., Bhunia A. Fundamental Food Microbiology. Foughth Edition. CRC Press, 2008, 492 p.
2. Sheppard S.K., Falush D. A candidate hopeful monster in the genus *Campylobacter*. In: *Campylobacter Ecology and Evolution*, ed. Sheppard S.K., 2014, Caister Academic Press, Norfolk, UK. 359 p., ISBN: 978-1-908230-2
3. Dasti J.I., Tareen A.M., Lugert R., Zautner A.T., Gross U. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediated mechanisms. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010; 3: 205-211.
4. Nachamkin I., Guerry P. *Campylobacter* infections. *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*. Wymondham, 2005: 285-293.
5. Nachamkin I. Chronic effects of *Campylobacter* infections. *Microbes Infect.*, 2002; 4: 399.
6. Nachamkin I., Allos B.M., Ho T. *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11: 555–567.
7. World Health Organization. The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9-11 July 2012. ISBN 978 92 4 156460 1. - www.who.int.
8. Nohra A., Grinberg A., Midwinter A.C., Marshall J.C., Collins-Emerson J.M., French N.P. Molecular Epidemiology of *Campylobacter coli* Strains Isolated from Different Sources in New Zealand between 2005 and 2014. *Appl. and Environ. Microbiol.* 2016; 82 (14): 4363-4370.
9. Van Dyke M.I., Morton V.K., McLellan N.L., Huck P.M. The occurrence of *Campylobacter* in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 109: 1053–1066. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04730.x>.
10. Eurosurveillance Editorial Team. 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *Euro Surveill.* 17:20113. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20113>