

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ И ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

Методические рекомендации



Москва 2023

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

---

---

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА  
КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ  
И ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ**

---

---

**Методические рекомендации**

Москва  
2023

**УДК: 616.98:579.843.1-07:619**

**ББК: 53.4:48.731.229**

**Л12**

Авторы:

**А.А. Сухинин, С.А. Макавчик, Л.И. Смирнова, С.В. Панкратов, В.А. Кузьмин,  
В.А. Гришина (ФГБОУ ВО СПбГУВМ), А.М. Гулюкин, Т.Н. Рождественская,  
С.В. Лопунов, Т.В. Степанова, А.И. Лаишевцев, А.В. Супова,  
А.В. Капустин (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Р.Х. Равилов, М.А. Ефимова (ФГБОУ ВО КГАВМ).**

Рецензенты:

**А.В. Прусаков, д-р вет. наук, доц., зав. кафедрой внутренних болезней животных  
им. А.В. Синева (ФГБОУ ВО СПбГУВМ),  
А.В. Яшин, д-р вет. наук, проф., проф. кафедры внутренних болезней животных  
им. А.В. Синева (ФГБОУ ВО СПбГУВМ);  
Д.О. Виноходов, д-р биол. наук, зав. кафедрой молекулярной биотехнологии,  
(ФГБОУ ВО СПбГИ (ТУ))**

Ответственный за выпуск –

**В.С. Галов, начальник отдела нормативно-правового регулирования  
в сфере обеспечения эпизоотической безопасности (Минсельхоз России)**

**Л12      Лабораторная диагностика кампилобактериоза сельскохозяйственных и до-  
машних животных: метод. реком. – М.: ФГБНУ «Росинформарготех», 2023. – 52 с.**

**ISBN 978-5-7367-1760-6**

Представлены доступные для бактериологических лабораторий методики бактериологического, серологического исследований и ПЦР на кампилобактериоз животных; методы родовой и видовой идентификации возбудителей с учётом современных возможностей лабораторной техники по созданию условий для культивирования и идентификации кампилобактерий.

Предназначены для студентов ветеринарных факультетов вузов, слушателей факультетов повышения квалификации, аспирантов, магистров, сотрудников ветеринарных лабораторий, практических ветеринарных врачей.

Одобрены и рекомендованы к изданию методическим советом ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (протокол № 11 от 28 октября 2021 г.), Координационным советом по проблемам животноводства, ветеринарии и АПК Европейского Севера Северо-Западного центра междисциплинарных исследований проблем продовольственного обеспечения – обособленного структурного подразделения ФГБНУ Санкт-Петербургский ФИЦ РАН (протокол № 2 от 12 октября 2021 г.), Научно-методической комиссией и Учёным советом ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (протокол № 4 от 1 октября 2021 г.), методическим советом ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» (протокол № 8 от 25 октября 2021 г.), Научно-техническим советом Минсельхоза России (протокол № 18 от 19 сентября 2022 г.).

УДК: 616.98:579.843.1-07:619

ББК: 53.4:48.731.229

ISBN 978-5-7367-1760-6

© Минсельхоз России, 2023

## Перечень сокращений и обозначений

АМП	антимикробные препараты – химические вещества, способные избирательно подавлять рост/размножение или вызывать разрушение/лизис микробных клеток
ВИЭВ	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
НГОВ	неферментирующие грамотрицательные бактерии
СЖН	сафранино-железо-новобиомициновая среда
СППА	сердечно-печеночный пептонный агар
ПЖА	полужидкий агар
ПЦР РВ	полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
ИХА	иммунохроматографический анализ
ELISA (ИФА)	иммуноферментный анализ, лабораторный иммунологический метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса «антиген-антитело» за счёт введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей её детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску
FDA/CFSAN	Центр безопасности пищевых продуктов и прикладного питания – Food and Drug Administration/Center for Food Safety and Applied Nutrition
MALDI-ToF-MS	физико-биохимический метод разделения белков в вакууме под действием лазерного луча для выявления маркеров патологического процесса на основе создания коллекций масс-спектров протеома виртуальных образцов
16S rRNA	молекулярно-генетическая идентификация на секвенаторе штаммов бактерий на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16s rRNA гена
S-	чувствительный к АМП штамм микроорганизма
R-	устойчивый к АМП штамм микроорганизма
FBP-добавка	селективная добавка для выделения кампилобактерий (Campylobacter Growth Selectavial (FBP))

## ВВЕДЕНИЕ

---

Кампилобактериоз – зоонозная инфекционная болезнь животных и человека, вызываемая патогенными микроорганизмами рода *Campylobacter*, характеризующаяся различной степенью тяжести и полиморфности проявлений. К кампилобактериозу восприимчивы крупный рогатый скот, овцы, реже свиньи, козы, куры, а также собаки.

Кампилобактериоз проявляется у животных поражением половых органов, частыми перегулами, бесплодием, массовыми абортми, рождением нежизнеспособного потомства, поражением кишечника и печени; у кур – гепатитом, снижением прироста массы тела цыплят-бройлеров, яйценоскости кур-несушек, падежом цыплят.

Бактерии рода *Campylobacter* широко распространены среди животных и птиц. Вопрос о взаимосвязи отдельных видов *Campylobacter* с отдельными видами хозяев изучен ещё недостаточно. При этом известно, что абсолютной связи «вид *Campylobacter* – вид хозяев» не существует, определённые микроорганизмы данного рода наиболее часто выделяются от нескольких видов животных. Однако установлено, что от птиц выделяется как правило 5 видов *Campylobacter*: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. laridis*, *C. hyointestinales* и *C. hepaticus*.

Распространение кампилобактериоза вызвано интенсификацией животноводства, птицеводства, возросшей международной торговли животными, птицей, кормами, продуктами животного происхождения. По своей распространенности кампилобактериоз не уступает сальмонеллёзу. Болезнь регистрируется почти во всех странах мира.

Согласно современной классификации и номенклатуре бактерий возбудителей данной болезни относят к роду *Campylobacter*. Род *Campylobacter* включает в себя более 20 видов (*cinaedi*, *coli*, *concisus*, *cryaerophila*, *fennelliae*, *fetus*, *hyointestinalis*, *jejuni*, *lari*, *mucosalis*, *nitrofigillis*, *sputorum*, *upsaliensis*, *Wolinella curva* (*C. curvus*) и *Wolinella succinogenes* и др.), из которых наибольшее значение в патологии животных имеют *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli*, реже *C. lari(dis)*, *C. sputorum*, *C. concisus* и др.

Некоторые виды объединяют подвиды и биовары. Так, вид *fetus* включает подвиды *fetus* и *venerealis*; вид *jejuni* – подвиды *jejuni* и

*doylei*; вид *sputorum* – биовары *sputorum*, *bubulus*, *fecalis*. Типовой вид – *C. fetus*.

Кампилобактериоз крупного рогатого скота вызывают *C. fetus sbs. fetus*, *C. fetus sbs. venerealis*, *C. jejuni*; овец – *C. fetus sbs. fetus*, *C. jejuni*; свиней – *C. hyointestinalis*; птиц – *C. jejuni*, *C. hepaticus*; собак – *C. jejuni* и *C. fetus sbs. fetus*.

Многие виды *Campylobacter spp.* колонизируют кишечник домашней птицы и водоплавающих птиц, но, как правило, не являются патогенными для птиц, за исключением *C. hepaticus*.

*C. hepaticus* является возбудителем пятнистой болезни печени у кур-несушек. Пятнистая болезнь печени (*Spotty Liver Disease, SLD*) – острый, очаговый некротический гепатит птиц, вызывающий смертность до 10% стада и снижение яйценоскости на 10-15%. Болезнь возникает в основном у кур при напольном содержании во время пика яйценоскости [6].

Бактерии *C. hepaticus* очень прихотливы, медленно растут при первичном выделении на средах, используемых для обычного культивирования *Campylobacter*. Появление новых видов *Campylobacter* требует пересмотра алгоритмов фенотипической идентификации. Коммерческие тестовые системы (API Campy) в настоящее время не позволяют идентифицировать *C. avium* и *C. hepaticus*. Необходимо обновить базы данных масс-спектрометрии MALDI TOF и разработать специфические праймеры для идентификации новых видов *Campylobacter*.

Изучение кампилобактериоза в Российской Федерации начато с большим опозданием, что сопряжено с рядом причин, в основном со сложностью и высокой стоимостью лабораторной диагностики, обусловленной особенностями культивирования кампилобактерий. Кампилобактериозная инфекция, столь широко распространённая во всем мире и по частоте выявления сопоставимая с сальмонеллёзом, в России диагностируется очень мало.

В целях диагностики кампилобактериоза применяют клинико-эпизоотологический, бактериологический, серологический, молекулярно-биологический методы. Клинико-эпизоотологический и серологический методы являются ориентировочными. Это связано со схожестью клинической и патологоанатомической картины при кампилобактериозе с клинической картиной, выявляемой и при дру-

гих заболеваниях; с отсутствием у исследователей единого мнения о величине диагностических титров и, в некоторых случаях, с выявлением ложноположительных результатов в реакции агглютинации. Бактериологический метод является основным, так как только выделение возбудителя дает право устанавливать диагноз. Бактериологическая диагностика, и особенно дифференциация кампилобактерий представляет определённые трудности. Для упрощения исследования предлагается методика выделения данных микроорганизмов с помощью мембранных и ядерных фильтров.

Бактериологические исследования животных на кампилобактериоз проводят согласно действующим нормативным документам:

ГОСТ ISO 10272-1-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы обнаружения и подсчёта бактерий *Campylobacter* spp. Часть 1. Метод обнаружения» [1].

ГОСТ Р 50396.2000 «Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьих. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям» [2].

Лабораторная диагностика генитального кампилобактериоза (вибриоза) крупного рогатого скота и овец: методические рекомендации. – М.: ФГБУ ЦНМВЛ, 2022 [3].

Методические рекомендации «Микробиологическая диагностика кампилобактериоза» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 26 декабря 2008 г. № 01/15702-8-34) [7].

МУК 4.2.2321-08 «Методы определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевых продуктах» [8].

Методические указания по лабораторной диагностике кампилобактериоза (вибриоза) сельскохозяйственных животных» (утв. ГУВ МСХ и П РБ 17.06.2008 № 10-1-5/613) [9].

МУК «Идентификация микроорганизмов с применением масс-спектрометра Maldi Biotyper microflex при исследовании продовольственного сырья и пищевых продуктов». – ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория, Россельхознадзор, 2011 г. 51. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы [11].

СанПиН 3.3686-21. Санитарные правила и нормы «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных

болезней» – п. XXX. – Лабораторная диагностика кампилобактериоза (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28.01.2021 № 4 (ред. от 25.05.2022), введенные ввиду утратившего силу СП 3.1.087-96 Ветеринарные правила ВП 13.4.1307-96 [14].

---

## 1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

---

Настоящие методические рекомендации устанавливают основные требования для организации системы лабораторной диагностики кампилобактериоза сельскохозяйственных и домашних животных в ветеринарных лабораториях, а также других учреждениях, осуществляющих диагностику болезней животных, соблюдение которых обеспечивает предупреждение возникновения и распространения случаев заболевания кампилобактериозом на территории Российской Федерации.

Новизной данных методических рекомендаций являются современные методы лабораторной диагностики кампилобактериоза, изучение биологических свойств, алгоритмов диагностики *Campylobacter hepaticus*, который является возбудителем пятнистой болезни печени у кур-несушек.

---

## 2. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

---

Цель создания настоящих методических рекомендаций – дать описание современных методик бактериологического и серологического исследований животных на кампилобактериоз и альтернативных методов индикации кампилобактерий, основанных на амплификационных технологиях.

### Классификация кампилобактерий

Согласно современной классификации и номенклатуре бактерий возбудителя кампилобактериоза относят к семейству *Campylobacteraceae* роду *Campylobacter*.

В настоящее время данный род включает в себя следующие основные виды *Campylobacter* (рис. 1):



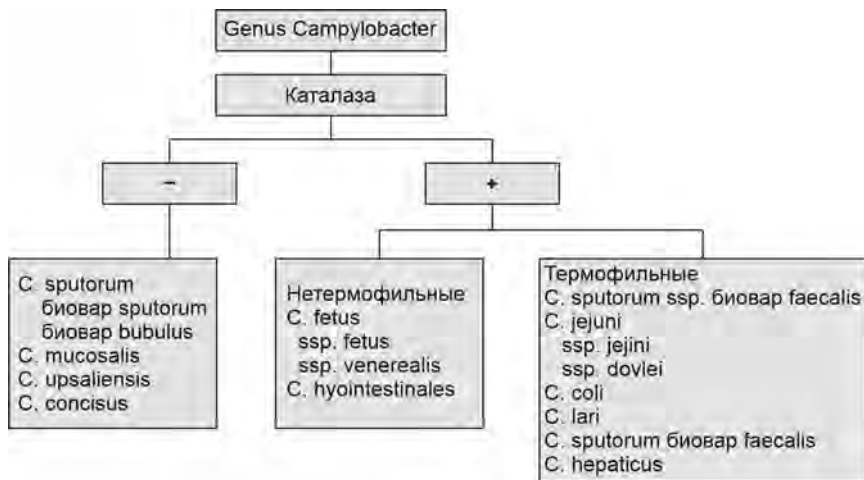


Рис. 1. Основные виды *Campylobacter* spp.

Научно обоснованным наименованием нозологической единицы, вызываемой кампилобактериями, вместо «вибриоза» следует считать «кампилобактериоз».

Представители рода *Campylobacter* – тонкие клетки диаметром 0,2-0,5 мкм и длиной 0,5-5,0 мкм. Могут иметь один или больше витков спирали и достигать длины 8 мкм. Характерны также S-образная форма и форма типа крыльев чайки, возникающие при соединении двух клеток в короткую цепочку. В старых культурах часто присутствуют сферические формы (кокковидные тела). Кампилобактерии грамотрицательные. Спиртоводные растворы анилиновых красителей воспринимают с трудом, в связи с чем кампилобактерий окрашивают разведённым 1:5 карболовым фуксином Циля. Спор и капсул не образуют. Подвижные, совершают характерное винтовое движение с помощью одиночных жгутиков без чехла, расположенных на одном или обоих концах клетки.

Кампилобактерии – хемоорганотрофы, микроаэрофилы. Оптимальной для инкубации является атмосфера, содержащая 5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> и 85% N<sub>2</sub>, однако многие штаммы способны к росту при концентрации кислорода до 15%.

Кампилобактерии требовательны к питательным средам. Углеводы не сбраживают и не окисляют. Кислых или нейтральных конечных продуктов не образуют. Для получения энергии используют аминокислоты или промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот, но не углеводы. Желатин не гидролизуют. Проба с метиловым красным и реакция Фогеса-Проскауэра отрицательные. Липазной активностью не обладают. Оксидазоположительны и уреазоотрицательны, за исключением некоторых штаммов *C. lari*. Пигментов не образуют.

Антигенная структура кампилобактерий достаточно сложная, представлена термолабильными Н-антигенами, термостабильными О-антигенами, К-антигенами. Различия в антигенном строении кампилобактерий используют для их серотипирования и иммунолюминесцентной микроскопии.

К факторам патогенности кампилобактерий относятся адгезины, жгутики, муциназу, энтеротоксины, эндотоксин, цитотоксин. Поверхностные специфические адгезины обеспечивают колонизацию слизистой оболочки кишечника. Жгутики кампилобактерий обуславливают их подвижность и способность к перемещению вдоль эпителия. Муциназа способствует проникновению бактерий через слой слизи, покрывающий эпителий кишечника.

Термолабильный холероподобный энтеротоксин является разновидностью экзотоксина. Патогенные кампилобактерии, в том числе *C. fetus ssp. fetus* и *C. jejuni*, образуют энтеротоксины. Термостабильный энтеротоксин высвобождается после гибели бактерий и вызывает общую интоксикацию организма. Энтеротоксины нарушают водно-солевой обмен путём образования циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Эндотоксин кампилобактерий подобно эндотоксинам других грамотрицательных бактерий вызывает развитие токсикоза, обладает пирогенным действием.

Дизентериеподобный цитотоксин высвобождается после гибели патогенных бактерий *C. fetus ssp. fetus* и *C. jejuni* и вызывает гибель эндотелиальных клеток.

В патогенезе заболевания важную роль играют адгезивные и инвазивные свойства микроба, способность кампилобактерий размножаться в присутствии желчи. Благодаря наличию жгути-

ков, кампилобактерии проникают через слизь, движутся вдоль эпителия тонкой кишки и прикрепляются к эпителиальным клеткам.

После гибели кампилобактерий высвобождается термостабильный энтеротоксин и дизентериеподобный цитотоксин, которые вызывают гибель эпителиальных клеток и оказывают общее токсическое действие на организм.

Кампилобактерии устойчивы в различных биологических субстратах (моча, фекалии, вода), особенно при низкой температуре. В воде, навозе, корме при 20°C погибают в течение 10-20 суток. В воде сохраняются до 37 дней. Высушивание убивает их через 3 ч, при 55°C гибнут в течение 10 мин.

Обычные дезинфектанты в дозах, применяемых для дезинфекции, убивают кампилобактерий за 5-10 мин. Лучшие дезинфицирующие средства при кампилобактериозе – карболовая кислота, креолин, лизол, формалин, едкая щелочь, хлорная известь. Калия перманганат не пригоден для этих целей.

Кампилобактерии чувствительны к стрептомицину, эритромицину, неомицину, тетрациклину, хлорамфениколу, сульфаниламидам и нитрофуранам, некоторым цефалоспорином, фторхинолонам [5].

---

### **3. ОТБОР ОБРАЗЦОВ**

---

У самцов (быков, хряков, баранов, кобелей) на наличие кампилобактерий исследуют сперму, препуциальную слизь, периферическую кровь.

У самок (коров, свиней, овец, сук) – вагинально-цервикальную слизь (в первые 3-4 дня после аборта), плаценту (не позднее, чем через сутки после аборта), периферическую кровь. Абортированные плоды следует доставлять в лабораторию целиком, если плодные оболочки не разорвались, то в них, чтобы не допустить обсеменения посторонней микрофлорой, а в лаборатории из абортированного плода отбирают головной мозг, содержимое желудка, печень, лёгкие, селезенку, содержимое грудной и брюшной полостей, слизистую оболочку кишечника.

У молодняка (телят, поросят, ягнят, щенков) и взрослых животных при кишечной форме кампилобактериоза – периферическую кровь и фекальные массы.

От животных, убитых с диагностической целью, на исследование направляют влагилице, матку, лимфатические узлы тазовой полости, от птиц – сердце, печень, желчный пузырь, слизистую оболочку кишечника.

Фекальные массы, помет собирают сразу после естественного акта дефекации из судна (тщательно вымытого и не содержащего следов дезинфектантов) или с пелёнки с помощью стерильной стеклянной палочки, проволочной петли, деревянного шпателя и помещают в стерильную посуду (стеклянную пробирку, вакуумный проботборник, контейнер транспортировочный со средой для анаэробов или специальными средами с активированным углём и без него для выделения *Campylobacter spp.*). При наличии в испражнениях патологических примесей (слизь, хлопья, эпителий, гной), за исключением крови, их включают в отбираемую пробу.

Отбор с использованием ректальных петель (тампонов). Стерильную ректальную петлю (тампон) вводят в прямую кишку на глубину 5-6 см. Взятый материал переносят в стерильную пробирку с 3-5 мл 0,85%-го стерильного физиологического раствора или в транспортировочную среду.

Отбор проб смывов осуществляют с использованием стерильных одноразовых пробирок, заполненных транспортировочной средой, рекомендованной для кампилобактерий, позволяющих сохранить свойства искомым бактерий (транспортировочная среда Кэри-Блэра, среда Эймса без угля/с углем, тиогликолевая среда для кампилобактерий, система со средой Амiesа без угля/с углем, полужидкая среда по Вангу).

Материал для исследования от быков – сперма, препуциальная слизь и секрет придаточных половых желез.

Материал из препуция получают приборами Г.К. Корчака, Р.В. Казеева, Я.А. Крылова и другими. От быков ремонтных и используемых в вольной случке кроме препуциальной слизи берут секрет семенных пузырьков, для чего производят массаж рукой через прямую кишку.

Абортированные плоды, плацента и органы животных пригодны для исследования в первые 10-12 ч после аборта или убоя животных. В летний период этот материал транспортируют в таре со льдом, а зимой его направляют в замороженном виде.

Цервикальную слизь берут с помощью прибора НИСП-1 Р.В. Казеева полистироловой пипеткой, соединенной со шприцом (Н.Н. Михайлов, М.А. Лучко), или прибором, описанным П.А. Триленко.

Материал для исследования доставляют в ветеринарную лабораторию специалистом в области ветеринарии в закрытой таре со льдом. Принимая во внимание, что бактерии *Campylobacter* весьма чувствительны к замораживанию, отобранные образцы не замораживают повторно и хранят при температуре от 0 до 4°C, анализируя их в максимально короткие сроки.

Пробы биологического материала необходимо отбирать до начала антибактериальной терапии.

### **Условия и сроки хранения и транспортировки проб**

Кампилобактерии плохо переносят транспортировку.

При возможности доставки нативных фекалий в лабораторию в течение одного часа транспортные среды можно не использовать.

При необходимости продолжительной транспортировки используют транспортировочные среды: 0,1%-ная пептонная вода, среда контроля стерильности и другие. Соотношение материал/среда должно быть 1:3-1:5. Применение транспортных сред обязательно при отборе проб ректальными петлями.

Сроки хранения материала в транспортных средах при температуре 4°C в зависимости от вида среды:

- в изотоническом растворе натрия хлорида в течение 6-24 ч;
- в 0,1%-ной пептонной воде – 72 ч;
- в средах контроля стерильности – 5-7 суток.

---

## **4. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ**

---

В микробиологических лабораториях используют стандартное испытательное и вспомогательное оборудование, средства измерения, питательные среды, химические реагенты, оборудование для культивирования, выделения, идентификации кампилобактерий, в том числе:

- трековые мембраны с диаметром пор 0,45 и 0,55 мкм;
- сухие газогенерирующие пакеты для микроанаэрофилов;
- термостат с регулируемой газовой средой, или микроанаэро-стат, или системы для инкубации микроаэрофильных и анаэробных микроорганизмов;
- люминесцентный микроскоп любой доступной модели [7, 8, 9, 11, 13, 20].

Для лабораторной диагностики кампилобактериоза должны использоваться питательные среды и реагенты, разрешенные к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке (приложения).

---

## **5. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КАМПИЛОБАКТЕРИЙ**

---

Постановка окончательного диагноза на кампилобактериоз у сельскохозяйственных и домашних животных в большинстве случаев невозможна без лабораторных методов исследования ввиду отсутствия патогномичных симптомов и схожести клинической и патоморфологической картины, характерных для других болезней.

К современным лабораторным методам, используемым для диагностики кампилобактериоза и дифференциации кампилобактерий в мировой ветеринарной и научной практике, относятся MALDI-TOF, 16S rRNA секвенирование, ПЦР и др. методики, перечисленные в OIE Terrestrial Manual [3, 6, 9, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 21].

### **Протеомный метод**

Метод *MALDI-TOF-MS* анализа рекомендуется для применения в рутинной практике микробиологических лабораторий при видовой идентификации УПМ. Технологическое усовершенствование условий культивирования и методологических способов ведения масс-спектрометрического исследования позволяет достоверно повысить качество видовой идентификации труднодиагностируемых микроорганизмов: неферментирующих бактерий, коринебактерий и дрожжевых грибов.

Метод выявляет уникальный набор белков микроорганизмов, своеобразный «отпечаток пальца» – «протеомная дактилоскопия». Позволяет проводить и субтипирование микроорганизмов [10].

### **Молекулярно-генетический метод**

Проведение молекулярно-генетического типирования обязательно при оценке идентичности изолятов микроорганизмов, выявленных из различных источников, и нерезультативном применении при этом комплекса традиционных (фенотипических) методов.

Образование L-форм обусловлено влиянием неблагоприятных факторов внешней среды (например, применением антибиотиков и дезинфектантов, действующих на клеточную стенку). В условиях организма больного животного даже тогда, когда антибиотикотерапия не применяется, многие факторы самого организма (лейкоцитарные ферменты, низкое значение pH, лизоцим, система комплемент-антитело и др.) могут способствовать образованию измененных форм бактерий, близких L-вариантам. Образованию L-форм также способствует некорректное применение антисептиков в животноводческих и птицеводческих хозяйствах.

В последнее время для выявления бактерий в любой форме существования широко применяются молекулярно-генетические методы, и в первую очередь полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Метод ПЦР применительно к клинико-диагностическим целям расценивается как прямой метод диагностики наряду с бактериоскопическим и иммунофлуоресцентным методами. Метод ПЦР направлен на непосредственное выявление возбудителя, точнее его генетического материала в конкретной пробе био- или патматериала, при

наличии выделения чистой культуры возбудителя кампилобактериоза.

Методический подход на основе ПЦР позволяет обойти основную трудность, связанную с тестированием бактерий, находящихся в некультивируемом состоянии, так как дает возможность заменить размножение бактерий как таковых амплификацией видоспецифичного для данной бактерии фрагмента ДНК. Применение быстрых молекулярных диагностических тестов на основе петлевой изотермической амплификации позволяет существенно упростить процедуру и сократить время исследования [3, 6, 19].

Для обнаружения ДНК кампилобактерий применяют ПЦР в режиме реального времени и с электрофорезом с использованием тест-системы для диагностики кампилобактериоза [3, 14].

Идентификация возбудителей инфекций животных, в том числе кампилобактериоза, протеомным и молекулярно-генетическим методами имеет следующие показания к проведению:

- сложность проведения видовой дифференциации микроорганизмов с измененными биологическими свойствами (морфологическими и культурально-биохимическими) с использованием стандартных микробиологических тестов;
- сокращение времени на идентификацию эпизоотически значимых штаммов микроорганизмов и необходимость своевременного проведения противоэпизоотических мероприятий [6, 10].

### **Бактериологические методы исследований**

Проводить бактериологическое исследование с диагностической целью необходимо в наиболее ранние сроки от начала заболевания (с момента развития первых клинико-морфологических проявлений инфекции) до начала антибиотикотерапии.

#### ***Задачи бактериологического исследования:***

- приём и оценка качества биоматериала, подлежащего исследованию (оценка полноты заполнения направления или сопроводительной информации, а также маркировки, целостности контейнера, соблюдения условий взятия и транспортировки, соответствия вида клинического материала предполагаемой инфекционной патологии);



- выбор оптимальных питательных сред для первичного посева и накопления возбудителя с учетом свойств искомого микроорганизма и посевных доз;

- соблюдение стандартных принципов посевов и режимов культивирования;

- изучение фенотипических характеристик выделенных чистых культур, в первую очередь биохимических свойств;

- определение таксономического положения (родовой, видовой, внутривидовой принадлежности) выделенной культуры согласно классификационным таблицам;

- оценка клинического значения выделенных микроорганизмов;

- определение чувствительности к антимикробным препаратам;

- формирование ответа о результатах исследования [4, 6, 8, 9, 16-18].

При кампилобактериозе бактериологическое исследование обеспечивает постановку этиологического диагноза и контроль освобождения организма от возбудителя.

### ***Микроскопический метод***

Одним из распространенных приёмов бактериологического исследования является бактериоскопический (микроскопический) метод.

Для изучения нефиксированных бактерий пользуются двумя методами: «раздавленной (между предметным и покровным стеклами) капли» и «висячей капли». Бактериоскопический метод основан на обнаружении в окрашенном препарате микроорганизмов с характерной морфологией (мелкие изогнутые S-образные палочки, «крылья летящей чайки») или клеток с характерной морфологией в сочетании с молниеносной подвижностью (препарат «раздавленная капля», при фазово-контрастной или тёмнопольной микроскопии).

Длина клеток кампилобактерий составляет 0,5-5 мкм, толщина – 0,2-0,8 мкм, спор и капсул не образуют. В старых культурах бактерии часто принимают сферические или кокковые формы.

Бактериоскопический метод является достоверным лишь при обсеменённости кампилобактериями  $\geq 10$  КОЕ в 1 мл материала [8] и имеет только дополнительное, ориентировочное значение в диагностике кампилобактериоза.

Микроскопические исследования используют для прижизненной и посмертной диагностики кампилобактериоза.

Объектами для микроскопического исследования являются периферическая кровь, сперма, вагинальная, препуциальная слизь, отпечатки или взвесь паренхиматозных органов, слизистой оболочки кишечника.

Кампилобактерии обнаруживают в исследуемом материале в нативных препаратах с использованием тёмнопольной микроскопии. Для этого готовят препараты типа «раздавленная капля».

Периферическую кровь (предварительно обработанную стабилизатором – 1,5%-ным раствором лимоннокислого натрия в соотношении 1:2) отстаивают в течение одного часа и прозрачный верхний слой без эритроцитов микроскопируют.

Для исследования окрашенных препаратов крови или вагинальной слизи мазки фиксируют в пламени горелки, а затем окрашивают разведённым 1:5 фуксином Циля в течение 1-2 мин. При положительном результате в препарате обнаруживают типичные по морфологии кампилобактерии.

Для повышения специфичности микроскопического исследования используют иммунолюминесцентную микроскопию препаратов. Флуоресцентная микроскопия применяется для обнаружения кампилобактерий в патологическом материале и смешанных культурах, дифференциации патогенных кампилобактерий от непатогенных. Однако этим методом нельзя провести внутривидовую дифференциацию кампилобактерий [5, 7-9, 13].

### ***Культуральный метод***

При дифференциальной диагностике кампилобактериоза от других острых кишечных инфекций бактериологическое исследование с выделением возбудителя является единственным методом, так как клиническое течение инфекционного процесса не всегда позволяет различить эти нозологические формы (рис. 2) [8].

Перед посевом фекальные массы разводят в соотношении 1:10 стерильным физиологическим раствором или 0,1%-ной пептонной водой и тщательно суспензируют.



Рис. 2. Схема бактериологической диагностики кампилобактериоза

Для выделения чистых культур кампилобактерий возможны 3 варианта посева исследуемого материала:

- 1 – посев с использованием фильтров;
- 2 – посев на селективные питательные среды;
- 3 – посев на неселективные питательные среды допускается при отборе биоматериала из стерильного локуса, с применением ядерных фильтров.

Кампилобактерии – микроаэрофилы. Кислород необходим для их роста, но становится токсичным для микроорганизмов в избыточном количестве. Для большинства штаммов оптимальной является концентрация кислорода 3-6%. Кампилобактерии являются капнофилами, т. е. нуждаются в высоких концентрациях  $\text{CO}$  (до 10%).

### ***Создание микроаэрофильных условий инкубации***

В случае использования вакуум-термостата или анаэроостата при помощи вакуумного насоса в приборе создается разрежение –  $0,75 \text{ кг/см}^2$ .

Затем в прибор из баллона впускают углекислый газ до отметки – 0,65 кг/см<sup>2</sup>.

При отсутствии баллонов газовая смесь указанного состава создаётся следующим образом:

а) при помощи вакуумного насоса в приборе создается разрежение – 0,75 кг/см<sup>2</sup>;

б) углекислый газ образуется в результате химической реакции, протекающей при увлажнении смеси равных количеств  $\text{NaHCO}_3$  (гидрокарбонат натрия, или сода) и  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  (лимонная кислота). Сода и лимонная кислота вносятся в резиновый газгольдер, роль которого может выполнять резиновый воздушный шар с отводной трубкой, перекрываемой зажимом. Добавление в газгольдер воды вызывает выделение углекислого газа. Прибор заполняется углекислым газом газгольдера до показаний манометра – 0,65 кг/см<sup>2</sup>;

в) обогащение азотом производится за счёт атмосферного воздуха, из которого предварительно удалён кислород. Это достигается применением двух соединённых последовательно поглотителей Зайцева, узкая часть которых заполнена раствором следующего состава: вода дистиллированная – 100 мл, КОН – 50 г, пирогаллол А – 5 г.

Для более полного поглощения кислорода необходимо подобрать скорость заполнения прибора таким образом, чтобы не допускать интенсивного «закипания» поглощающего раствора.

## **Методы очистки загрязнённых культур**

Для получения чистых культур кампилобактерий применяют различные методы очистки.

Если бактерии-контаминанты неподвижны, культуру засевают в ПЖА с добавлением бриллиантового зеленого и желчи, либо СЖН, и заполняют ими пастеровские пипетки. Вместо пастеровских пипеток можно использовать пробирки с ПЖА и 7-сантиметровыми стеклянными трубками. Материал смешивают со средой в количестве 1-1,5 мл, а затем осторожно подсасывают до расширенной части пипетки. Ей придают горизонтальное положение, конец запаивают на горелке и ставят в пробирку, на дне которой имеется кусочек ваты.

Высеваемость кампилобактерий повышается, если материал предварительно центрифугировать в течение 10 мин при 1000 мин<sup>-1</sup>. и высевать надосадочную жидкость [4, 11, 13].

Применяют также *биологические методы* очистки культур. С этой целью вводят внутривентрально морским свинкам 0,5-1,0 мл или белым мышам 0,3-0,5 мл культуры. Через 10 мин животных убивают и производят посев из органов на питательные среды. Этот метод не всегда даёт ожидаемый результат.

Более эффективна методика выделения чистых культур путем вагинального заражения самок белых мышей, которым материал вводят в дозе 0,1 мл двукратно с интервалом 24 ч. Через 6-7 дней мышей убивают и вскрывают. Посевы производят стерильными инструментами из рогов матки в ПЖА. Рост культур проверяют на 3-й, 6-й и 9-й дни термостатирования.

Беременным морским свинкам вводят внутривентрально или во влагалище 0,5 мл культуры. При аборте производят посевы из абортированных плодов. Если аборт не происходит, животных убивают и делают посевы из эмбрионов и слизистой оболочки матки [4, 13].

При наличии в культуре подвижной микрофлоры материал суспензируют в физиологическом растворе и *фильтруют через мембранный* фильтр пористостью 0,45 мкм [8, 9, 1, 13]. Фильтратом засевают в 4-6 пробирок с ПЖА.

Метод фильтров предназначен для обнаружения кампилобактерий в материалах с высокой степенью микробной обсемененности (например, в пробах фекалий, помёта).

Метод может быть использован как для непосредственного посева материала, так и для пересева из консерванта или сред обогащения.

### ***Характеристика фильтров***

Для очистки культуры методом фильтрации могут быть использованы фильтрующие мембраны двух типов: мембранные фильтры из ацетата целлюлозы («Владипор» МФА-МА № 5 и № 6 или другого производителя) и ядерные фильтры с диаметром пор 0,45 и 0,55 мкм. Мембранные фильтры менее эффективны, чем ядерные, поскольку до 90% кампилобактерий сорбируется материалом фильтра.

### ***Подготовка фильтров***

Фильтрующие мембраны «Владипор» МФА-МА № 5 и № 6 стерилизуют кипячением. Для этого фильтры складывают стопками по 10-15 шт., стопки помещают в конверт из фильтровальной бумаги. Подготовленная таким образом упаковка погружается в стакан с кипящей дистиллированной водой. Через 5-7 мин конверт вынимают и отжимают между листами стерильной фильтровальной бумаги. Фламбированным пинцетом накладывают фильтры на поверхность эритрит агара с 5% крови и FBP-добавками. Для посева каждой пробы используется по одному фильтру № 5 и № 6. Целесообразно использовать одноразовые чашки диаметром 40 мм.

Полотно ядерного фильтра с диаметром пор 0,45 и 0,55 мкм разрезают на квадраты со стороной 3 см, перекладывают листами крафт-бумаги, заворачивают в общий пакет и стерилизуют автоклавированием при 121°C 15 мин, или воздушной стерилизацией при 180°C 60 мин. Предпочтительней использовать автоклавирование, так как в воздушном стерилизаторе отмечается сильная электризация фильтров.

Для посева каждой пробы используется по одному фильтру с диаметром пор 0,45 и 0,55 мкм.

### ***Применение фильтров***

Исследуемый материал суспендируют в консерванте или в физиологическом растворе в соотношении 1:5-1:9.

Стерильной пипеткой или стеклянной палочкой на поверхность мембранного фильтра наносят 5-8 капель суспензии, при использовании ядерных фильтров наносят 1-2 капли.

Через 15-30 мин фильтры удаляют пинцетом и сбрасывают в дезраствор.

Посевы культивируют в течение 48 ч в микроаэрофильных условиях. При отсутствии роста посевы инкубируют до 10 суток.

Для создания микроаэрофильных условий инкубации могут быть использованы:

1. Газогенерирующие пакеты.
2. Газовая смесь в баллонах.
3. Свечной сосуд.

Наиболее оптимальным вариантом является культивирование в микроанаэростатах, или термостатах с регулируемой атмосферой. При их отсутствии хорошие результаты могут быть получены при использовании контейнеров СТО-10-1-ОС («Сборник твердых радиоактивных отходов») или эксикаторов.

Посевы инкубируют при температуре 37,5°C. При целенаправленном выделении *C. jejuni* первичные посевы инкубируют при 42°C.

В зависимости от температурного диапазона роста кампилобактерии делят на две группы: 1) нетермофильные (*C. faecalis*, *C. hyointestinalis*, *C. fetus*, *C. consicus*) – температурный оптимум 37°C; 2) термофильные (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) – температурный оптимум 42-43°C.

Применение метода ядерных фильтров позволяет проводить посев материала на неселективные питательные среды. Использование ядерных фильтров с диаметром пор 0,46 и 0,55 мкм и отказ от внесения в среду селективных добавок способствует сокращению времени выделения кампилобактерий до 24 ч инкубации; возможности обнаружения разных видов кампилобактерий; росту возбудителя в чистой культуре, что значительно упрощает учёт результатов посева; снижению стоимости анализа.

Ядерные фильтры размером 3х3 см, стерилизованные автоклавированием при 121°C в течение 30 мин, переносятся пинцетом на подсушенную питательную среду. Затем на поверхность фильтров пипеткой наносят 0,1 мл суспензии фекалий в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида или консерванте. Через 30 мин экспозиции фильтры удаляют. Допускается повторное использование ядерных фильтров после обеззараживания кипячением в дистиллированной воде в течение 5 мин (без интенсивного кипения воды), промывания в проточной воде, просушивания, визуальной проверки целостности, стерилизации автоклавированием при 121°C в течение 30 мин [4].

### ***Посев на селективные питательные среды***

Для получения первичной культуры используют полужидкие и плотные питательные среды с добавлением крови или сыворотки.

Материал, интенсивно загрязненный сопутствующей микрофлорой, засевают на селективные среды:

1. Сердечно-печеночный пептонный агар (СППА) с добавлением 1-2% желчи крупного рогатого скота, 5-10% дефибринированной крови овец или бриллиантовой зелени 1:40000.

2. Селективный кровяной эритролит агар с FBP-добавкой.

3. СЖН.

4. Кампилобакагар (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболensk).

Для придания кровяному эритролит агару селективности используют смеси антибиотиков (табл. 1).

Таблица 1

#### **Прописи селективных добавок к питательным средам**

№ п/п	Состав	Концентрация препаратов <sup>1</sup>	Авторы и фирма-изготовитель
1	Ванкомицин Полимиксин В Триметоприм	10 2500 5	Skirrow M., 1977 Unipath-Oxoid, SR 69
2	Ванкомицин Полимиксин В Триметоприм	10 5000 5	Karmali M., Fleming P., 1979
3	Ванкомицин Полимиксин В Триметоприм Цефалотин Амфотерицин В	10 2500 5 15 2	Blaser M. et al., 1978 BBL; Unipath-Oxoid, SR 98
4	Колистин Бацитрацин Новобиоцин Цефалотин Циклогексимид	10000 25000 5 15 50	Lauwers S. et al., 1978 Unipath-Oxoid, SR 85

<sup>1</sup> Концентрации колистина, полимиксина, бацитрацина даны в ЕД/л, для остальных препаратов – в мг/л.



№ п/п	Состав	Концентрация препаратов <sup>1</sup>	Авторы и фирма-изготовитель
5	Колистин Цефоперазон Рифампицин Амфотерицин В	10000 15 10 2	Goossens H. et al., 1983
6	Цефоперазон Рифампицин Амфотерицин В	30 10 2	Goossens H. et al., 1986 <sup>*</sup> Virion
7	Колистин Бацитрацин Новобиоцин Цефалотин Циклогексимид	40000 25000 5 15 50	Patton C. et al., 1981
8	Цефоперазон Амфотерицин В	32 10	Bolton F. et al., 1988 Unipath-Oxoid, SR155E
9	Полимиксин В Триметоприм Рифампицин Циклогексимид	5000 10 10 100	Bolton F. et al., 1982 Unipath-Oxoid, SR117
10	Цефоперазон Триметоприм	30 50	Goossens H. et al., 1988

### ***Посев на неселективные среды***

Применение метода ядерных фильтров позволяет проводить посев материала на неселективные питательные среды.

Посев стерильного материала или материала, имеющего небольшое количество микрофлоры, можно проводить на неселективные среды:

1. Среда Китта-Тароцци без масла.
2. Среда Мартена.
3. Полужидкий 0,15-0,2%-ный мясопептонный агар (ПЖА).
4. Мясо-печеночный пептонный 2%-ный агар (МППА).
5. Кровяной эритроцит агар с ФВР-добавкой.

Посев биологического материала на питательные среды проводят в момент отбора образцов или не позднее 6 ч после отбора. Если сразу провести посев невозможно, то исследуемый материал доставляют в лабораторию в одной из специальных транспортировочных сред для кампилобактерий. Их использование позволяет проводить посев материала не позднее 24 ч после его взятия.

Для получения первичной культуры кампилобактерий используют полужидкие и плотные питательные среды с добавлением крови или сыворотки.

Материал, интенсивно загрязненный сопутствующей микрофлорой, засевают на селективные среды: сердечно-печеночный пептонный агар (СППА) с добавлением 1-2% желчи крупного рогатого скота, 5-10% дефибринированной крови овец или бриллиантовой зелени 1:40000;

селективный кровяной эритрит агар с FBP-добавкой; СЖН; Кампилобакагар.

Для придания кровяному эритрит агару селективности используют смеси антибиотиков (см. табл. 1).

Концентрации колистина, полимиксина, бацитрацина даны в ЕД/л, для остальных препаратов – в мг/л.

Посев биологического материала на питательные среды проводят в момент отбора образцов или не позднее 6 ч после отбора. Если сразу сделать посев невозможно, то исследуемый материал доставляют в лабораторию в одной из специальных транспортных сред: редуцированной щелочной пептонной воде, среде Кэри-Блэр. Их использование позволяет проводить посев материала не позднее 24 ч после его взятия.

---

## 6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ КУЛЬТУР КАМПИЛОБАКТЕРИЙ

---

### Родовая и видовая идентификация культур кампилобактерий

Идентификацию выделенных культур осуществляют по совокупности культуральных, морфологических и биохимических свойств, а также путем проведения молекулярно-биологических исследований.

Большинство этиологически значимых кампилобактерий обладают каталазой, оксидазой и супероксиддисмутазой.

#### *Морфологические свойства кампилобактерий*

*Микроскопия мазков.* Из подозрительных колоний готовят мазки, фиксируют в пламени и окрашивают фуксином Циля, разведенным 1:5, или кристалл-виолетом.

*КОН-тест.* Учитывая плохую окрашиваемость кампилобактерий, этот тест может быть рекомендован вместо окраски по Граму. На предметное стекло наносится капля 3%-го КОН, в которой суспендируют в течение 30с полную петлю исследуемой культуры. Грамотрицательные кампилобактерии при этом разрушаются с выходом нуклеиновых кислот, что делает содержимое капли вязким.

При выявлении микроорганизмов с характерной морфологией (изогнутые палочки S-образные или в виде крыльев чайки) проводят традиционные тесты: определение цитохромоксидазы (с использованием стандартных наборов и реактивов), продукция каталазы со свежеприготовленным 3%-ным раствором перекиси водорода, КОН-тест с 3%-ным раствором КОН.

*Культуральные свойства.* В полужидкой среде (ПЖА) кампилобактерии растут в виде тонких нежных серовато-белых дисков на расстоянии 1-3 мм от поверхности.

На плотных питательных средах кампилобактерий можно зарегистрировать через 48-96 ч. Эти мельчайшие голубоватые колонии, плохо видимые невооруженным глазом, постепенно достигают

1-3 мм в диаметре. Величина, форма размер колоний зависит от концентрации агара, влажности питательной среды, свойств культуры, степени её диссоциации. Описаны 4 формы колоний: S-форма (гладкие), гладкостекловидные, M- и R-формы.

*C. jejuni* на плотных питательных средах с добавлением крови образуют колонии без гемолиза двух типов:

1) низкие, плоские, с краями неправильной формы, блестящие, влажные, полупрозрачные, растекаются по поверхности среды, имеют тенденцию к слиянию (характерны для «свежих» культур, содержащих извитые формы клеток);

2) круглые, гладкие, приподнятые, с ровными краями, 1-2 мм в диаметре (характерны для «старых» культур, содержащих кокковидные формы).

*C. coli* на плотных питательных средах с добавлением крови образуют колонии диаметром 1-2 мм без гемолиза, гладкие, выпуклые, блестящие с рыжевато-коричневым оттенком.

На полужидких средах кампилобактерии растут в виде диска, 3-5 мм от поверхности среды.

На СЖН при росте чистой культуры розовый цвет среды не изменяется, при смешанном росте или размножении только других видов микробов среда становится ярко-желтой.

Принцип бактериологического метода основан на выявлении живых микроорганизмов в исследуемом субстрате при посеве на специальные питательные среды с последующей инкубацией в термостате при заданной температуре в микроаэрофильных условиях. Изучение культуральных и ферментативных свойств полученных микроорганизмов позволяет идентифицировать бактерии рода *Campylobacter*.

На следующем этапе исследования проводится идентификация выделенной культуры.

### **Биохимические свойства кампилобактерий**

Проявление некоторых биохимических свойств кампилобактерий в зависимости от температуры инкубирования (температурный тест).

Как правило, при постановке этого теста определяется способность штамма к росту при температуре 25, 37 и 42°C.

Постановка температурного теста возможна как на плотной, так и на полужидкой среде, причём последнюю надо признать более предпочтительной. Посев культуры осуществляют в столбик полужидкого агара в 3 пробирки, после чего одну инкубируют при 25°C, вторую – при 37°C, а третью – при 42°C. Инкубацию осуществляют в аэробных или микроаэрофильных условиях в течение 48 ч. При использовании для осуществления температурного теста плотной среды посевы обязательно инкубируют в микроаэрофильных условиях.

Основной трудностью, возникающей при постановке данного теста, является нестабильность работы термостатов при температурных режимах ниже 28°C, особенно в южных регионах в жаркое время года.

Рост при 25°C. Учёт проводят по наличию или отсутствию видимого роста. Термофильные бактерии рода *Campylobacter* не способны к росту при температуре 25°C, но растут при 42°C (табл. 2).

Таблица 2

### Дифференциальные признаки кампилобактерий

Вид	Каталаза	Рост		Гидролиз гиппурата	Продукция сероводорода	Устойчивость	
		при 42 °C	на среде с 1,5% NaCl			к наитдиксовой кислоте	к цефалотину
<i>C.sputorum</i> биовар <i>sputorum</i>	-	-	+	-	+	R	S
биовар <i>bubulus</i>	-	-	+	-	+	S/R	S
биовар <i>faecalis</i>	+	(+)	+	-	+	S/R	S
<i>C.upsaliensis</i>	(+)	+	-	-	-	S	S
<i>C.fetus</i> ssp. <i>Fetus</i>	+	-	+	-	+/-	R	S
ssp. <i>Venerealis</i>	+	-	-	-	-	S/R	S
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>Jejuni</i>	+	+	-	+	-	S	R
ssp. <i>doylei</i>	+	+	-	+	-	S	S
<i>C.coli</i>	+	+	-	-	+	S	R
<i>C.lari</i>	+	+	+	-	+	R	R
<i>C.mucosalis</i>	-	+	+	-	+	S/R	S
<i>C.hepaticus</i>	+	+		+/-	-	S/R	S

**Примечание.** (+) – наличие признака; (-) – отсутствие признака;

(±) – вариабельность признака; S – чувствительность; R – резистентность.

### **Тест на каталазу**

Тест предназначен для дифференциации каталазопозитивных и каталазонегативных кампилобактерий.

В каплю свежеприготовленного 3%-го раствора перекиси водорода на предметном стекле вносят петлю исследуемой культуры. Бурное выделение пузырьков газа расценивают как положительный результат. Положительный контроль – *E. coli*, отрицательный – микроорганизмы из рода *Streptococcus*.

Бактерии рода *Campylobacter* каталазоположительны, за исключением редко встречающегося вида *C. upsaliensis*. Штаммы *C. upsaliensis*, как правило, слабо продуцируют каталазу, и для её обнаружения рекомендуется после внесения культуры в  $H_2O_2$  накрыть каплю покровным стеклом и учёт реакции проводить при малом увеличении микроскопа [8, 9, 11, 13].

### **Оксидазный тест**

Разработаны многочисленные варианты определения цитохромоксидазы. Наиболее часто из них используются следующие.

1. На фильтровальную бумагу, смоченную 1%-ным водным раствором тетраметил-п-фенилендиамина гидрохлорида, наносят платиновой петлей или запаянной пастеровской пипеткой исследуемые культуры. Появившееся через 5-20 с пурпурное окрашивание расценивают как положительный результат.

2. 40 мг а-нафтола растворяют в 2,5 мл этилового спирта, 60 мг диметил-п-фенилендиамина – в 7,5 мл дистиллированной воды. Растворы смешивают, пропитывают реактивом фильтровальную бумагу и наносят на нее петлей исследуемые культуры. При положительном результате через 5-20 с появляется интенсивное синее окрашивание.

При использовании индикаторных полосок для определения оксидазы техника постановки реакции не отличается от описанной выше. В случае использования коммерческого набора для оксидазного теста следуют инструкциям производителя. Положительным результатом считается появление синего окрашивания в течение 10-30 с.

При постановке оксидазного теста необходимо использовать положительные и отрицательные контроли. В качестве положительно-го контроля необходима культура *Ps. aeruginosa*, в качестве отрица-

тельного – *E. coli*. При получении сомнительного результата реакцию повторяют через сутки со свежей культурой.

Бактерии рода *Campylobacter* оксидазоположительны. Не рекомендуется проводить постановку данной реакции с колониями, выращенными на угольном агаре, т.к. они могут не давать характерной окраски (сиреневой, фиолетовой или синей) [8, 9].

### ***Рост в присутствии хлорида натрия***

Посев суспензии чистой культуры производят на поверхность кровяного агара, содержащего 3,5% NaCl (15 мл кровяного агара и 2,04 мл 5 М раствора натрия хлорида), и на кровяной агар без содержания хлорида натрия. Посевы инкубируют в микроаэрофильных условиях при температуре  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  48 ч.

### ***Тест на гидролиз гиппурата***

Свежеприготовленный 1%-ный раствор гиппурата натрия в дистиллированной воде разливают в преципитационные пробирки по 0,4 мл (в замороженном состоянии при минус  $20^{\circ}\text{C}$  пробирки можно хранить в течение нескольких месяцев). Две петли культуры с плотной среды суспендируют в растворе гиппурата. Пробирку инкубируют в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч.

После инкубации на водную фазу аккуратно по стенке пробирки насаивают 0,2 мл нингидринового реактива.

Для приготовления нингидринового реактива *ex tempore* растворяют 350 мг нингидрина в 10 мл смеси ацетона и бутанола в соотношении 1:1 объём/объём.

**!** ПРОБИРКУ НЕ ВСТРЯХИВАЮТ! Продолжают инкубацию при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин. Появление темно-фиолетовой окраски свидетельствует о гидролизе гиппурата с образованием глицина. Отсутствие изменения окраски или слабое фиолетовое окрашивание расценивается как отрицательный результат.

В случае использования коммерческих дисков для обнаружения гидролиза гиппурата следуют инструкциям производителя.

К гидролизу гиппурата способны *Campylobacter jejuni*, представители других видов рода *Campylobacter* не ферментируют гиппурат [8, 9, 11, 13].

### ***Рост в присутствии 1% глицина***

Суспензию чистой культуры инокулируют на среду, содержащую глицин (15 мл среды на основе крови с 1,65 мл 10%-го водного раствора стерильного глицина), и на ту же среду без глицина. Посевы инкубируют в микроаэрофильных условиях при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  48 ч.

### ***Определение устойчивости кампилобактерий к налидиксовой кислоте и цефалотину***

Определение проводят по общепринятой методике с использованием стандартных бумажных дисков согласно МУК 4.2.2321-08.

Двухсуточную агаровую культуру *Campylobacter spp.* суспендируют в стерильном физиологическом растворе и стандартизуют по оптическому стандарту мутности на 10 ед. Полученную бактериальную взвесь, содержащую 10 КОЕ/мл, в количестве 1 мл наносят на поверхность агара Мюллера-Хинтон с добавлением 5% крови барана, равномерно распределяют покачиванием, избыток взвеси отсасывают пастеровской пипеткой. Чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10-15 мин. На поверхность инокулированной чашки накладывают диски с цефалотином и налидиксовой кислотой. Чашки инкубируют в микроаэробных условиях при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 48-72 ч.

Рост в контакте с диском расценивается как устойчивость, наличие зоны задержки роста любых размеров – как чувствительность. Бактерии рода *Campylobacter* устойчивы к цефалотину (за исключением видов *C. hyointestinalis* и *C. upsaliensis*) и к налидиксовой кислоте (за исключением *C. coli* и *C. upsaliensis*). Среди *C. jejuni* могут быть штаммы как устойчивые, так и чувствительные к налидиксовой кислоте [8, 9, 11, 13].

### ***Утилизация глюкозы, лактозы, сахарозы и продукция сероводорода ( $\text{H}_2\text{S}$ )***

Способность выделенных бактерий утилизировать сахара и продуцировать сероводород изучают по росту на скошенном столбике трехсахарного железосодержащего агара (ТСА). Обильно засевают чистой культурой исследуемого микроорганизма поверхность ско-



шенной части ТСА с последующим уколом в столбик среды. Инкубирование осуществляют в микроаэробных условиях при температуре 25, 37 или 42°C в течение 24 ч и продолжают, если необходимо, до 5 дней.

Учет результатов проводят по наличию изменения цвета поверхности скошенной части ТСА и цвета столбика среды в пробирке, формированию газа в среде. При неспособности к утилизации сахаров и продукции  $H_2S$ , цвет поверхности скошенной части ТСА и самого столбика остается неизменным, пузырьки газа и расслоение среды отсутствуют. Появление желтого окрашивания столбика, либо поверхности скошенной части ТСА свидетельствует об утилизации одного из сахаров, газообразование – об утилизации глюкозы, а появление черного окрашивания в толщестолбика – о формировании  $H_2S$ . Бактерии рода *Campylobacter* не утилизируют углеводы. Продуцировать сероводород могут штаммы вида *C. coli* [8, 9, 13].

Для определения вида выделенной культуры основным тестом является гидролиз гиппурата, позволяющий дифференцировать *C. jejuni* от других видов. Кроме того, для идентификации используют также определение устойчивости к налидиксовой кислоте, цефалотину, температурный тест, ТТХ (0,04%-ный трифенилтетразолий хлорид), продукция нитратредуктазы и др.

Образование сероводорода ( $H_2S$ ) на среде с цистеином. Постановку теста осуществляют на бульоне для бруцелл (*Brucella* broth), содержащем 0,02% цистеина. Суспензию культуры засевают в данную среду, инкубируют при  $37 \pm 1^\circ C$ . Учет результатов проводят через 72 ч. На поверхности бульона образуется черная полоска ацетата свинца.

Для большинства практических лабораторий Российской Федерации постановка некоторых из этих тестов проблематична, что связано с необходимостью приобретения различных химических ингредиентов для реактивов, сложностью их приготовления, трудностями при тестировании и интерпретации результатов.

Поэтому для видовой идентификации кампилобактерий могут применяться коммерческие диагностические системы (стрипы), содержащие высушенные субстраты.

Учет и интерпретацию результатов проводят визуально путем сравнения результатов с идентификационной таблицей.

## Серологическая дифференциация кампилобактерий

Подтверждение выделенных культур к роду *Campylobacter* возможно с использованием реакции латекс-агглютинации и иммунохроматографического (ИХА) теста.

В настоящее время возможна первичная идентификация колоний, подозрительных на кампилобактериозные, с помощью латексного агглютинационного набора (*Campylobacter test kit*, ф. OXOID или аналогичный), который состоит из карт с сухим кампилобактер-реагентом, имеющих тестовую и контрольную поверхность, экстрагирующего реагента 1 (раствора уксусной кислоты), экстрагирующего нейтрализующего реагента 2 (трис буфера, содержащего 0,09% азида натрия в качестве консерванта), положительного контрольного реагента.

Методика основана на взаимодействии латексных частиц тестовой поверхности, сенсibilизированных кроличьими антителами, с поверхностными антигенами клеток кампилобактерий.

С целью дифференциации кампилобактерий применяют реакцию агглютинации (РА) с вариантоспецифическими сыворотками и антигеном из исследуемой культуры. Выделенный штамм пересевают три раза на ПЖА с 10% аминокислотами-2 для адаптации к питательной среде, а затем на плотную среду, которая отличается от ПЖА лишь большим количеством агар-агара (2-3%). Эту среду после стерилизации охлаждают до 65-70°C, после чего к ней добавляют 20% стерильного обезжиренного молока или 10% аминокислотами-2, или 10% дефибринированной стерильной крови крупного рогатого скота или барана.

Культуру штамма пересевают по 0,3-0,5 мл на 4-5 чашек с плотной средой, ставят их в эксикатор, добавляют в него 20% двуокиси углерода и производят термостатирование в течение 2-3 суток. Культуру проверяют на чистоту. Незагрязненный рост смывают физиологическим раствором с 0,3% формалина, дважды промывают его тем же раствором на центрифуге при 3000 мин<sup>-1</sup>, а затем доводят до концентрации 1 млрд/мл микробных клеток и используют в РА с тремя вариантоспецифическими и нормальной сыворотками кролика.

Реакцию ставят в пробирках в объеме 1 мл. Каждую из трех сывороток разводят формализованным 3%-ным раствором хло-

ристого натра 1:25, 1:50, 1:100 и 1:200. Затем в каждое разведение сыворотки добавляют равное количество (0,5 мл) проверяемого антигена.

Контроли: стандартный антиген плюс формализированный 3%-ный раствор хлористого натрия; проверяемый антиген с тем же раствором; нормальная сыворотка кролика в разведениях с 1:25 до 1:200 плюс проверяемый антиген.

Пробирки опыта и контроля встряхивают, ставят на сутки в термостат при 37°C, а затем выдерживают 3-4 ч при комнатной температуре и учитывают реакцию. Её оценивают по степени просветления столбика жидкости и образования рыхлого осадка. В случаях полного просветления столбика жидкости и образования рыхлого осадка реакцию признают положительной, а если просветление неполное и имеется осадок, реакцию считают сомнительной. Отрицательная реакция – отсутствие феномена агглютинации. Аналогичная картина должна быть во всех пробирках с разведениями нормальной сыворотки кролика и стандартным антигеном, а также со стандартным антигеном, проверяемым антигеном и 3%-ным формализированным раствором хлористого натрия.

Штамм кампилобактерий относят к тому варианту, с сывороткой которого получена полная агглютинация антигена. Если же две сыворотки агглютинировали антиген в одинаковом разведении, то реакцию повторяют до установления предельного титра и по нему судят о серологической принадлежности штамма.

При постановке реакции можно пользоваться живым антигеном. Исследуемую культуру выращивают на ПЖА или среде Китта-Тароцци без масла, а затем переносят по 0,5 мл в четыре пробирки бульона Хоттингера. Через двое суток роста в первую пробирку вносят 0,1 мл (две капли) сыворотки 1-го серовара, а во вторую и третью – сыворотку 2-го и 3-го сероваров. Четвертая пробирка – контроль. Пробирки встряхивают и выдерживают сутки в термостате. В положительном случае происходит просветление культуры с образованием на дне рыхлого осадка. Если культура кампилобактерий агглютинирована двумя сыворотками, реакцию ставят по вышеописанному классическому методу [12].

### *Серологические методы диагностики кампилобактериоза*

Иммунохроматографический анализ (ИХА) – экспресс-метод с применением тест-системы для диагностики кампилобактериоза [21].

Для обнаружения кампилобактерий во влагалищной слизи коров и телок используют реакцию агглютинации (РАВС). Она основана на обнаружении в слизи агглютининов с помощью кампилобактериозного антигена. Агглютинины появляются в слизи через 1,5-4 месяца после заражения, в случае кампилобактериозного аборта у коров они обнаруживаются в первые дни.

Слизь берут марлевым тампоном, который готовят из бинта длиной 10-12 см, сворачивая до размера сливы, перевязывают ниткой, а затем её наматывают на тампон и помещают в пробирку, конец нитки фиксируют пробкой. Тампоны стерилизуют в автоклаве.

Перед взятием слизи производят туалет наружных половых органов. Извлеченный за нитку тампон зажимают корнцангом с длинными браншами и вводят во влагалище на 20-25 см до упора в свод. Корнцанг разжимают и извлекают, нитку обрезают, оставляя конец длиной 5-7 см. Необходимо иметь несколько корнцангов, использовать их после кипячения.

По истечении 45-60 мин тампон удаляют, помещают в пробирку, этикетировать и отправляют в лабораторию. В пробирки добавляют по 5 мл 3%-го NaCl с 0,3%-ным формалином, ставят до утра следующего дня в холодильник для экстрагирования слизи. При хранении в холодильнике пробы пригодны для реакции в течение 7 суток.

Перед реакцией тампоны со слизью отжимают и выбрасывают. В необходимых случаях экстракт слизи фильтруют через бумажный фильтр или центрифугируют в течение 20-30 мин при 3000 мин<sup>-1</sup>.

Реакцию ставят в четырех разведениях в объеме 1 мл. Во вторую, третью, четвертую пробирки наливают 3%-ный раствор хлористого натрия с 0,3%-го формалина. Экстракт слизи разливают в первую и вторую пробирки по 0,5 мл. Содержимое второй пробирки перемешивают и 0,5 мл переносят в третью пробирку, из третьей – в четвертую, а из нее 0,5 мл смеси удаляют.

Во все четыре пробирки вносят по 0,5 мл стандартного кампилобактериального антигена с концентрацией 1 млрд/мл микробных клеток.

Контроли к реакции:

1. На самоагглютинацию. К 0,5 мл антигена добавляют 0,5 мл формализованного 3%-го раствора NaCl.

2. На активность. В каждое разведение типоспецифической сыворотки от 1:50 до 1:400 добавляют 0,5 мл испытуемого антигена.

3. На специфичность. В разведения нормальной сыворотки кролика 1:100 и 1:200 вносят по 0,5 мл того же антигена.

Пробирки опыта и контроля встряхивают и ставят на сутки в термостат, а затем выдерживают при комнатной температуре в течение 3-4 ч. Учёт реакции начинают с контролей. При правильном ходе реакции контроли 1-й и 3-й должны быть отрицательными, а 2-й – положительным. После этого учитывают ход реакций в опыте.

Положительная реакция: ++++ или +++ (4 или 3 креста) – полное просветление жидкости во всех пробирках или только в первой и второй и неполное просветление в третьей и четвертой пробирках. На дне образуется рыхлый осадок, который при встряхивании разбивается в мелкие хлопья.

Сомнительная реакция: ++ или + (2 или 1 крест) – неполное просветление жидкости в первой и второй пробирках, небольшое количество осадка на дне их.

Отрицательная реакция (-) – феномен агглютинации отсутствует во всех четырех пробирках.

Реакция агглютинации с сывороткой крови и молока не применяется для диагностики кампилобактериоза.

Положительная РАВС подтверждает наличие кампилобактериоза в стаде, но по ней нельзя ставить диагноз на это заболевание. Для этого нужно выделить культуру возбудителя болезни [4, 10-13].

## **Заключение**

---

Для своевременной диагностики, эффективного лечения и профилактики кампилобактериоза необходимо проводить комплексные лабораторные исследования, которые включают в себя бактериологические, серологические, молекулярно-генетические, протеометрические методы, что позволяет наиболее достоверно идентифицировать возбудителя инфекции и определить его чувствительность к антибактериальным препаратам, а также осуществлять регулярный серологический мониторинг основного стада для исключения нарушений обмена веществ и развития иммуносупрессии, способных усугубить воспалительный процесс и затруднить лечение животных.

## Список литературы

1. ГОСТ ISO 10272-1-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы обнаружения и подсчета бактерий *Campylobacter spp.* Часть 1. Метод обнаружения».

2. ГОСТ Р 50396.2000 «Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьих. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям».

3. Лабораторная диагностика генитального кампилобактериоза (вибриоза) крупного рогатого скота и овец: метод. рекомендации / Скоморова Ю.А., Кремлева А.А., Кожевникова М.В. и др. – Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор). – М.: ФГБУ ЦНМВЛ, 2022. – Электронная публикация. СПб, 2022. – Доступ из локальной сети ИБК СПбПУ (чтение). – В связи с отменой действия документа «Временная инструкция о мероприятиях по диагностике, профилактике и ликвидации вибриозов крупного рогатого № 115-6а» от 06.03.1979.

4. ВП 13.4.1307-96 «Санитарные правила. Ветеринарные правила. Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. Кампилобактериоз». (утв. начальником Департамента ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации В.М. Авиловым, 18.06.1996).

5. Лабораторные исследования в ветеринарии. Бактериальные инфекции: справ. // Сост. Б.И. Антонов, В.В. Борисова, П.М. Волкова и др. – М.: Агропромиздат, 1986. – 352 с.

6. **Макавчик С.А.** Современные методы видовой идентификации термофильных бактерий рода *Campylobacter* / Макавчик С.А., Смирнова Л.И., Сухинин А.А., Кузьмин В.А., Рождественская Т.Н., Панкратов С.В. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2021. – № 11. – С. 27-34.

7. Методические рекомендации «Микробиологическая диагностика кампилобактериоза» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 26 декабря 2008 г., № 01/15702-8-34).

8. МУК 4.2.2321-08 Методические указания 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевых продуктах (утв. Роспотребнадзором 24.01.2008).

9. Методические указания по лабораторной диагностике кампилобактериоза (вибриоза) сельскохозяйственных животных» (утв. ГУВ МСХ и ПРБ 17.06.2008 № 10-1-5/613).

10. Методические рекомендации по диагностике и профилактике кампилобактериоза крупного рогатого скота / Герасимов С.В., Макавчик С.А., Сухинин А.А., Гришина В.А., Идиатулин И.Г. / ФГБОУ ВО СПбГАВМ. – СПб: Лема, 2017. – 24 с.

11. МУК «Идентификация микроорганизмов с применением масс-спектрометра Maldi Biotyper microflex при исследовании продовольственного сырья и пищевых продуктов». – ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория, Россельхознадзор, 2011 г. 51. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы.

12. Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. 4. Кампилобактериоз. Санитарные правила. СП 3.1.087-96. Ветеринарные правила. ВП 13.4.1307-96 (утв. Госкомсанэпиднадзором РФ 31.05.1996 № 11, Минсельхозпродом России 18.06.1996 № 23) (с изм. от 18.04.2011).

13. **Савин И.С.** Усовершенствование диагностики кампилобактериоза свиней: дис. ... канд. вет. наук. – Санкт-Петербург, 2008. – 147 с.

14. СанПиН 3.3686-21. Санитарные правила и нормы «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» – п. XXX. Профилактика кампилобактериоза. – Лабораторная диагностика кампилобактериоза (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28.01.2021 № 4 (ред. от 25.05.2022), введенного ввиду утратившего силу СП 3.1.087-96 Ветеринарные правила ВП 13.4.1307-96.

15. **Скляр О.Д.** Разработка и совершенствование средств и методов диагностики бруцеллеза и кампилобактериоза животных: дис. ... д-р вет. наук. – М., 2006. – 271 с.

16. **Яковлев О.А.** Разработка контроля контаминации продукции птицеводства термофильными кампилобактериями: дис. ... канд. биол. наук. – М., 2010. – 139 с.

17. FDA/CFSAN Bacteriological Analytical Manual. Chapter 7. «Isolation of Campylobacter Species from Food and Water». – 2001. – 20 p.

18. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, chapters 3.4.4. (2021), 3.10.4. (2018).

19. ВОЗ. Кампилобактериоз [Электронный ресурс]. [WHO.Campylobacteriosis [electronic resource]. (In Russ.) Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>.

20. Разработка и применение методики на основе петлевой изотермической амплификации (Iamp) для диагностики кампилобактериоза /Шуряева А.К., Малова Т.В., Толоконцева А.А. и др. // Клиническая практика. – 2021. – т. 12. – № 3. – С. 30-35.

21. Методы выявления патогенных микроорганизмов с использованием иммунохроматографических экспресс-тестов производства Merck (Германия). – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.



## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1

#### Прописи питательных сред для культивирования кампилобактерий

1) Селективная среда для выделения кампилобактерий – железозэритринный кровяной агар (ЖЭКА). Состав основы: эритрит агар (сухой) – 36,0 г; экстракт кормовых дрожжей – 4,0 г; сернокислое железо ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) – 0,04 г; вода дистиллированная – до 1000,0 мл pH 7,2±0,2. Ингредиенты размешивают в 1000,0 мл дистиллированной воды, доводят до кипения и кипятят 2-3 мин до полного растворения. Среду разливают по 200,0 мл в колбы или флаконы и стерилизуют автоклавированием 20 мин при 121°C. В остуженную до 50-55°C питательную основу вносят аэротолерантную добавку (метабисульфит натрия – 0,1 г/л и пируват натрия – 0,25 г/л), гемолизированную баранью, лошадиную кровь – 7%, селективную добавку (амфотерицин В – 3,0 мг, фузидин натрия – 10,0 мг, цефалотин – 15,0 мг, рифампицин – 20,0 мг). Разливают в чашки Петри по 15-20,0 мл.

2) Железо-эритрит-кровяной агар (ЖЭКА), сухой. Среда предназначена для выделения кампилобактерий. Состав основы, г/л: гидролизат кильки – 17,9; эритрит – 0,0122; тиаминбромид – 0,005; железа закисного сульфат – 0,04; экстракт кормовых дрожжей – 4,0; глюкоза – 1,0; натрия хлорид – 5,9; натрия карбонат – 2,5; агар – 11,2; вода дистиллированная – 1000,0 мл pH 7,3±0,2. Навеску препарата, указанную на этикетке, размешивают в 1000,0 мл дистиллированной воды, кипятят в течение 1-2 мин до полного растворения агара, стерилизуют при 121°C 20 мин. Перед употреблением среду расплавляют, охлаждают до 45-50°C, добавляют «лаковую кровь» и раствор смеси антибиотиков (№ 1 или № 2). Для приготовления «лаковой крови» к 20,0 мл дефибринированной крови животных или человека добавляют 46,0 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Среду можно хранить в холодильнике до 14 дней. Перед употреблением чашки подсушивают 40-60 мин в термостате при 37°C. Бактерии рода *Campylobacter* на плотных питательных средах образуют колонии без гемолиза двух типов. Чаще встречается плоская форма колоний с ровными краями диаметром 2-8 мм. Колонии бесцветные или светло-серого цвета, гомогенные, напоминающие капли жидкости, расплескавшейся по поверхности агара. Колонии второго типа – мелкие (1,0-2,0 мм в диаметре)

круглые с ровными краями, гладкие блестящие, заметно возвышающиеся над поверхностью, гомогенные, бесцветные, приобретающие желтоватый оттенок при длительном культивировании. Выпускается коммерческая отечественная среда.

3) Мясопептонно-печеночный полужидкий агар (МПППА). Среда может быть использована для обнаружения и кратковременного хранения культур, а также проведения температурного теста. Состав: мясная вода – 250,0 мл; печеночный отвар – 250,0 мл; пептон бактериологический – 10,0 г; хлорид натрия  $\text{NaCl}$  – 5,0 г; агар – 1,6 г; вода дистиллированная – 500,0 мл pH 7,3±0,1. После растворения всех ингредиентов и расплавления агара устанавливают pH. При необходимости среду фильтруют, стерилизуют при 121°C 20 мин, охлаждают до 45-50°C и разливают по 5,0-7,0 мл в пробирки. Кампилобактерии сохраняют жизнеспособность в этой среде до 6-7 суток. В пробирочных полужидких средах кампилобактерии образуют зону роста в виде диска на глубине 1,0-2,0 мм от поверхности среды.

4) Модифицированная (полужидкая) среда для теста редукции нитратов. Состав: Триптоза («Мегк») – 20,0 г; D-глюкоза – 1,0 г; натрия фосфат однозамещенный ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) безводный – 2,0 г; калия нитрат ( $\text{KNO}_3$ ) – 1,0 г; агар – 1,0 г; дистиллированная вода – до 1000,0 мл pH 7,2±0,2. Среду после приготовления разливают в пробирки по 9-10,0 мл и стерилизуют при 112°C 30 мин. Посевы инкубируют при 37°C в течение 72 ч в аэробных условиях. Учет результатов – по общепринятой методике.

5) Модифицированная среда для теста продукции сероводорода. Состав: дрожжевой экстракт – 3,0 г; пептон – 20,0 г; натрия хлорид ( $\text{NaCl}$ ) – 3,0 г; агар – 15,0 г; железа (III) аммоний цитрат – 0,18 г; натрия тиосульфат ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) безводный – 0,18 г; глюкоза – 0,6 г; феноловый красный (0,2%-ный водный раствор) – 12 мл; дистиллированная вода – до 1000 мл pH 7,0-7,1. Готовую среду разливают в пробирки по 7 мл, стерилизуют при 112°C 30 мин и скашивают в горячем виде. Учет – по наличию или отсутствию почернения среды в нижней части пробирки (в месте соприкосновения среды и конденсата).

6) Криоконсервант для низкотемпературного замораживания чистых культур кампилобактерий и аркобактеров (пропись Н.Лior). Состав: пептон ферментативный – 1,0 г; глицерин – 25,0 мл;  $\text{NaCl}$  – 0,5 г; вода дистиллированная – 75,0 мл pH 7,2. Криопротектор стерилизуют автоклавированием 15 мин при 121°C.

7) Модифицированная среда для лиофилизации штаммов кампилобактерий и аркобактеров (на 100,0 мл готовой среды). Состав: fetalная телячья сыворотка – 50,0 мл; уголь активированный бактериологический – 2,0 г; желатина (10% раствор) – 50,0 мл. Среду стерилизуют автоклавированием при 121°C 15 мин.

8) Селективный бульон (Престона) для накопления кампилобактерий.

Состав основы среды

Ингредиенты	Количество, г
Пептон	10,0
Мясной экстракт	10,0
Натрия хлорид	5,0
Агар	1,0
Вода	1000,0

Растворить основные компоненты в дистиллированной воде. При необходимости подогреть до кипения для полного растворения частиц. В случае необходимости установить pH  $7,5 \pm 0,2$  с помощью 0,1 н HCl или 0,1 н NaOH. Стерилизовать автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин. Остудить до 45-50°C.

#### *Приготовление полной среды*

Перед использованием в 1000 мл бульона асептически добавить: 70 мл стерильной дефибринированной крови барана; растворенное в 50%-ном растворе ацетона содержимое двух флакончиков с добавкой антибиотиков для кампилобактерий IV (по Престону) или I (по Блэйзер-Вонг) или растворенное в 50%-ном растворе этанола содержимое двух флакончиков с добавкой антибиотиков II (по Бутцлеру) и растворенное в стерильной дистиллированной воде содержимое двух флакончиков ростовой добавки для кампилобактерий или 4 мл аэротолерантной добавки, тщательно перемешать и разлить среду в соответствующие емкости в количествах, необходимых для проведения исследования.

9) Селективный бульон (Дойла) для накопления кампилобактерий.

Состав основы среды

Ингредиенты	Количество, г/л
Гидролизат казеина	10,0
Пептический перевар животной ткани	10,0

*Продолжение*

Ингредиенты	Количество, г/л
Дрожжевой экстракт	2,0
Глюкоза	1,0
Натрия хлорид	5,0
Натрия бисульфит	0,1
Натрия сукцинат	3,0
L-цистеина гидрохлорид	0,1
pH (при 25°C) $7,0 \pm 0,2$	

Используют готовую основу среды промышленного изготовления указанного состава.

Приготовление осуществляют согласно прописи на этикетке. Растворить сухую основу порошка в дистиллированной воде. При необходимости подогреть до кипения для полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин. Остудить до температуры 45°C.

*Приготовление полной среды*

Перед использованием в 500 мл бульона асептически добавить 35 мл стерильной дефибринированной крови барана, а также растворенное в 50%-ном растворе этанола содержимое одного флакончика с добавкой антибиотиков модифицированной III (по Дойлу). Тщательно перемешать и разлить в соответствующие емкости в количествах, необходимых для проведения исследования.

**Прописи неселективных питательных сред  
для культивирования кампилобактерий**

При исследовании на генитальный кампилобактериоз посев целесообразно производить на полужидкий агар ВГНКИ, 0,15% ПЖА с 10% дефибринированной крови или сыворотки крови, на 2%-ный мясо-печеночный пептонный агар, агар Мартена. Вместо мясной воды при изготовлении указанных сред используют экстракт мышцы сердца крупного рогатого скота, обогащают их кровью крупного рогатого скота, овец, кроликов (5-10%), сывороткой крови лошади (10%), экстрактом сухих дрожжей (5 г/1000 мл), а также добавляют тиогликолат натрия (0,5 г/1000 мл).

**Прописи готовых сред промышленного изготовления  
для культивирования кампилобактерий,  
разрешенных к применению в Российской Федерации**

1) Селективный агар Престона.

Состав основы среды

Ингредиенты	Количество, г
Пептон	10,0
Мясной экстракт	10,0
Натрия хлорид	5,0
Агар-агар	12,0
Вода	1000,0
pH (при 25°C) $7,5 \pm 0,2$	

Растворить основные компоненты в дистиллированной воде. При необходимости довести до кипения для полного растворения частиц. В случае необходимости установить pH  $7,5 \pm 0,2$  с помощью 0,1 н HCl или 0,1 н NaOH. Стерилизовать автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин. Остудить до 45-50°C.

*Приготовление полной среды*

Перед использованием в 1000 мл расплавленного и остуженного до 45-50°C агара асептически добавить: 70 мл стерильной дефибринированной крови барана; растворенное в 50%-ном растворе ацетона содержимое двух флакончиков с добавкой антибиотиков для кампилобактерий IV (по Престону) или I (по Блэйзер-Вонг), или растворенное в 50%-ном растворе этанола содержимое двух флакончиков с селективной добавкой для кампилобактерий II (по Бутцлер) и растворенное в воде содержимое двух флакончиков ростовой добавки для кампилобактерий или 4 мл аэротолерантной добавки, тщательно перемешать и разлить среду в стерильные чашки Петри слоем толщиной 4-5 мм.

## 2) Угольный селективный агар для кампилобактерий.

Состав основы среды.

Ингредиенты	Количество, г/л
Гидролизат казеина	3,0
Пептический перевар животной ткани	10,0
Мясной экстракт	10,0
Натрия хлорид	5,0
Железа сульфат	0,25
Натрия пироват	0,25
Уголь древесный бактериологический	4,0
Агар-агар	12,0
pH (при 25°C) $7,0 \pm 0,2$	

Используют готовую основу среды промышленного изготовления указанного состава.

Приготовление осуществляют согласно прописи на этикетке. Растворить порошок сухой основы в дистиллированной воде. Подогреть до кипения для полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин. Остудить до 45-50°C.

### *Приготовление полной среды*

В 500 мл расплавленного и остуженного до 45-50°C агара асептически добавить растворенное в 2 мл стерильной дистиллированной воды содержимое одного флакончика с добавкой антибиотиков САТ или растворенное в 2 мл стерильной дистиллированной воды содержимое одного флакончика с добавкой антибиотиков-V. Тщательно перемешать и разлить в стерильные чашки Петри слоем толщиной 4-5 мм.

## 3) Кампилобакагар.

Состав основы среды

Ингредиенты	Количество, г/л
Панкреатический гидролизат казеина	5,0
Кислотный гидролизат казеина	20,0
Агар	$15,0 \pm 3,0$
Натрий углекислый	0,1-0,4

Используют готовую основу среды промышленного изготовления указанного состава.

Приготовление осуществляют согласно прописи на этикетке. Растворить порошкообразную сухую основу в дистиллированной воде. Подогреть до кипения для полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин. Остудить до 45-50°C.

#### *Приготовление полной среды*

Перед использованием в 1000 мл расплавленного и остуженного до 45-50°C агара асептически добавить 70 мл стерильной дефибринированной крови барана. Содержимое флакона с селективной добавкой антибиотиков для кампилобакагара растворить в 1,5 мл стерильной дистиллированной воды с добавлением 5-7 капель 96%-ного этилового спирта. Полученную смесь антибиотиков в количестве двух флаконов добавить в агар, тщательно перемешать и разлить в стерильные чашки Петри слоем толщиной 4-5 мм.

#### 4) Колумбийский кровяной агар (неселективный).

Состав основы среды

Ингредиенты	Количество, г/л
Пептон (специальный)	23,0
Крахмал кукурузный	1,0
Натрия хлорид	5,0
Агар-агар	15,0
pH (при 25°C) $7,3 \pm 0,2$	

Используют готовую основу среды промышленного изготовления указанного состава.

Приготовление осуществляют согласно прописи на этикетке. Растворить порошкообразную сухую основу в дистиллированной воде. Подогреть до кипения для полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин. Остудить до 40-50°C и асептически внести 70 мл стерильной дефибринированной крови барана, тщательно перемешать и разлить в стерильные чашки Петри слоем 4-5 мм.

#### 5) Агар Мюллера-Хинтон.

Состав основы среды

Ингредиенты	Количество, г/л
Мясной настой	300,0
Гидролизат казеина	17,5
Крахмал	1,5
Агар-агар	17,0
pH (при 25°C) $7,3 \pm 0,2$	



Используют готовую основу среды промышленного изготовления указанного состава.

Приготовление осуществляют согласно прописи на этикетке. Растворить порошкообразную сухую основу в дистиллированной воде. Подогреть до кипения для полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин. Остудить до 45-50°C. Добавить 70 мл стерильной дефибринированной крови барана, тщательно перемешать и разлить в стерильные чашки Петри.

б) Трехсахарный железосодержащий агар (для идентификации).

Допускается использование двух модификаций среды: ТСА и среды № 13.

Состав сред

Ингредиенты, г/л	Среды	
	№ 13	ТСА
Пептический перевар животной ткани	10,0	20,0
Гидролизат казеина	10,0	-
Дрожжевой экстракт	3,0	3,0
Мясной экстракт	3,0	3,0
Лактоза	10,0	10,0
Сахароза	10,0	10,0
Глюкоза	1,0	1,0
Натрия хлорид	5,0	5,0
Железа сульфат	0,2	-
Железа (III) цитрат	-	0,3
Натрия тиосульфат	0,3	-
Натрия тиосульфат ( $\cdot 5H_2O$ )	-	0,3
Феноловый красный	0,024	0,024
Агар-агар	12,0	12,0
pH (при 25°C) $7,4 \pm 0,2$		

Используют готовые основы среды промышленного изготовления с указанным составом.

Приготовление осуществляют согласно прописям на этикетках. Растворить порошкообразную сухую основу в дистиллированной воде. Подогреть до кипения для полного растворения частиц. Тщательно перемешать и разлить в пробирки для тестирования. Стерилизовать автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин. Остудить среду в наклонном положении при комнатной температуре для формирования скоса и столбика высотой 2,5 см.

## СОДЕРЖАНИЕ

Перечень сокращений и обозначений .....	3
ВВЕДЕНИЕ .....	4
1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ .....	7
2. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ .....	7
3. ОТБОР ОБРАЗЦОВ .....	10
4. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ .....	13
5. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КАМПИЛОБАКТЕРИЙ .....	13
6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ КУЛЬТУР КАМПИЛОБАКТЕРИЙ .....	26
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	37
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	38
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	40
Приложение 1. Прописи питательных сред для культивирования кампилобактерий .....	40
Приложение 2. Прописи неселективных питательных сред для культивирования кампилобактерий .....	44
Приложение 3. Прописи готовых сред промышленного изготовления для культивирования кампилобактерий, разрешенных к применению в Российской Федерации .....	45

# **ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ И ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ**

*Методические рекомендации*

Редактор *Г.А. Ратавнина*

Обложка художника *Т.Н. Лапиной*

Компьютерная верстка *Т.П. Речкиной*

Корректор *С.И. Ермакова*

[fgnu@rosinformagrotech.ru](mailto:fgnu@rosinformagrotech.ru)

---

Подписано в печать 23.08.2023 Формат 60×84/16

Печать офсетная Бумага офсетная

Гарнитура шрифта «Times New Roman»

Печ. л. 3,25 Тираж 500 экз. Изд. заказ 67 Тип. заказ 153

---

Отпечатано в типографии ФГБНУ «Росинформагротех»,

141261, Российская Федерация, Московская обл.,

г.о. Пушкинский, рп. Правдинский, ул. Лесная, д. 60

ISBN 978-5-7367-1760-6



9 785736 717606 >

