

КОНЦЕПТУАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПРЕСС-ВЫЯВЛЕНИЮ *CAMPYLOBACTER SPP.* В МЯСЕ УБОЙНЫХ ЖИВОТНЫХ

Багаева Д.С.,* Минаев М.Ю., Юшина Ю.К., Соколова О.В., Зайко Е.В.

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

Ключевые слова: бактерии рода *Campylobacter*, говядина, птица, ПЦР.

Аннотация

Современный подход формирования качества продуктов питания, основанный на стандартах ИСО серии 9000, указывает на необходимость внедрения систем менеджмента качества на перерабатывающих предприятиях. Согласно анализу баз данных научных публикаций Science Direct (by Scopus) и Web of Science установлено, что исследованию мяса убойных животных (кроме птицы) на наличие бактерий рода *Campylobacter* посвящено только 0,5–1,7 % публикаций. Приоритетным методом исследования является ПЦР. Разработана готовая к применению ПЦР тест-система для выявления *Campylobacter spp.* на основе подобранных родоспецифичных праймеров к бактериям рода *Campylobacter*. Специфичность тест-системы установлена в отношении грамотрицательных бактерий родов *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, а также оксидазоположительных *Aeromonas*. Были подобраны родоспецифичные праймеры к бактериям рода *Campylobacter* и на их основе разработана готовая к применению ПЦР тест-система. Установлено, что подобранные праймеры имеют 100 % сходимость к геному бактерий рода *Campylobacter*, эффективность ПЦР составляет не менее 95 %, предел обнаружения не более 1×10^4 КОЕ/г. При оценке специфичности праймеров учитывалось, что бактерии рода *Campylobacter* могут находиться в консорциуме, обоснованным микробиомом желудочно-кишечного тракта, в основном с бактериями семейства *Enterobacteriaceae* и молочнокислыми бактериями. Однако среда обогащения Болтон является селективной и в процессе культивирования подавляет рост Грамположительных молочнокислых бактерий. Установлено, что подобранные праймеры обладают 100 % специфичностью и не дают ложноположительных реакций с указанной группой микроорганизмов. Разработанная тест-система была успешно проверена в раунде сличительных испытаний в системе FEPAS и внедрена в лабораторную практику. Доказано что разработанную тест-систему можно использовать как при скрининге на этапах обогащения бактерий рода *Campylobacter*, так и при идентификации чистой культуры микроорганизма.

Original scientific paper

CONCEPTUAL APPROACHES TO THE RAPID DETECTION OF *CAMPYLOBACTER SPP.* IN MEAT OF SLAUGHTER ANIMALS

Dagmara S. Bataeva,* Mihail Yu. Minaev, Yuliya K. Yushina, Olga V. Sokolova, Elena V. Zajko

V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Key words: of the genus *Campylobacter*, beef, poultry, PCR.

Abstract

The modern approach to quality assurance of food products based on the ISO 9000 standards indicates the need for the implementation of quality management systems in processing plants. According to the analysis of scientific publication databases (Science Direct and Web of Science), it is established that only 0.5–1.7 % of publications are related to studying meat of slaughter animals (except for birds) concerning the presence of *Campylobacter*. The priority method of investigation is PCR. Ready-to-use PCR test system was developed for the detection of *Campylobacter spp.* on the basis of selected gene-specific primers to bacteria of *Campylobacter* genus. Specificity of the test system is established for Gram-negative bacteria of *Salmonella*, *Escherichia*, and *Proteus* genera, and for oxidase-positive *Aeromonas*. Gene-specific primers for *Campylobacter* were selected and ready-to-use PCR test system was developed on their basis. It was found that the selected primers have 100 % convergence to the genome of *Campylobacter* genus bacteria, the PCR efficiency is not less than 95 %, and the detection limit is not more than 1×10^4 CFU/g. When estimating the specificity of the primers, it was taken into account that the bacteria of *Campylobacter* genus may be incorporated in a consortium with intestine microbiome, mainly with *Enterobacteriaceae* and lactic acid bacteria. However, Bolton's enrichment medium is selective and, during the cultivation process, suppresses the growth of Gram-positive lactic acid bacteria. It was found that the selected primers were 100 % specific and did not give false positive reactions with this group of microorganisms. The developed test system was successfully validated in a cycle of qualitative tests in the FEPAS system and implemented into laboratory practice. It was proved that the developed test system may be used both in screening at the stages of *Campylobacter* enrichment and in identification of pure culture of the microorganism.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Багаева Д.С., Минаев М.Ю., Юшина Ю.К., Соколова О.В., Зайко Е.В. Концептуальные подходы к экспресс-выявлению *Campylobacter spp.* в мясе убойных животных. Теория и практика переработки мяса. 2017;2(4):76-95. DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-76-95

FOR CITATION: Bataeva D.S., Minaev M.Yu., Yushina Yu.K., Sokolova O.V., Zajko E.V. Conceptual approaches to the rapid detection of *Campylobacter spp.* in meat of slaughter animals. *Theory and practice of meat processing*. 2017;2(4):76-95. (In Russ.) DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-76-95

Введение

Прогрессирующий мутагенез патогенных микроорганизмов пищевого происхождения представляет пандемическую опасность для современного мира. Проявляя стремительную изменчивость, как на генетическом, так и на фенотипическом уровне, патогены приобретают устойчивость к различным факторам воздействия, в т. ч. и окружающей среды. Это приводит к расширению ареала их распространения.

Ряд микроорганизмов в настоящее время являются наиболее опасными в связи с их широким распространением в природной среде, высокой выживаемостью и патогенностью. К таким микроорганизмам относят и бактерии семейства капнофильных эпсилон-протеобактерий *Campylobacteriales*, в частности бактерии рода *Campylobacter* и *Helicobacter* [1].

Кроме того, Всемирная Организация Здравоохранения выделяет среди патогенных микроорганизмов несколько наиболее опасных, с точки зрения возрастающей устойчивости, в число которых входят и бактерии рода *Campylobacter* [2].

В отчете ВОЗ «Глобальный взгляд на кампилобактериоз» отмечено, что кампилобактериоз является недооцененным заболеванием. Частота инфицирования возбудителем этого заболевания населения стремительно растет. В отчете выделяют два вида, такие как *C. jejuni* и *C. coli* как наиболее опасные, несмотря на то что из 16 видов *Campylobacter* двенадцать считаются патогенными [3, 4].

Бактерии рода *Campylobacter*, во всем мире рассматриваются как наиболее распространенные пищевые патогены, вызывающие заболевание кампилобактериоз (вibriоз) со следующим патогенезом: кишечные инфекции, энтериты, бактериемию, колиты, септические артриты, гемоуремический синдром. В осложненных случаях может вызывать синдром Рейтера или Гийена-Барре. В отдельных случаях возможен летальный исход, в основном у групп населения, входящих в группу риска по причине ослабленного иммунитета. Согласно информационному бюллетеню ВОЗ, источником заражения соответственно и причинами гастроэнтеритов обычно является мясо птицы, прошедшее недостаточную термообработку [5].

В 2007 году Международные Комиссии Codex Alimentarius Commission (CAC) и Codex Committee on Food Hygiene призвали к более тщательному изучению и контролю бактерий рода *Salmonella* и *Campylobacter* [6, 7].

Исследованиями 148 проб пищевых продуктов (листовые салаты, овощи, сырое молоко, мясо цыплят, куриные сырые субпродукты, индейка, перепела, говядина и смывы с различных поверхностей), проведенных в «ФИЦ питания и биотехнологии», установлена их контаминация и выявлено 50 штаммов бактерий рода *Campylobacter*, большая часть которых была представлена видом *C. jejuni*. Чаще всего в пище-

вые продукты кампилобактерии попадают в результате контаминации, в том числе с поверхности основного и вспомогательного оборудования. *Campylobacter jejuni* является наиболее патогенным представителем своего рода в связи широкой лекарственной устойчивостью к противомикробным препаратам, в т.ч. к хинолонам [8, 9].

Принимая во внимание, что птица (особенно перелетная) может быть переносчиком кампилобактерий, характер распространения этого патогена среди животных стремительный, и сложно контролируемый [4].

В связи с зоонозой природой патогена и широкой распространенностью, фактор риска заражения кампилобактериями сохраняется на любом предприятии, перерабатывающем мясо, особенно птицы. Также важно учитывать устойчивость этих бактерий к условиям окружающей среды. Кампилобактерии способны выживать в широком диапазоне температур от 4 до 43 °С. Из-за этой особенности их относят к термотолерантным микроорганизмам. Во влажных природных объектах (вода, навоз, почва, сено и проч.) при температуре 18–27 °С *Campylobacter* выживают более месяца; в продуктах животного происхождения при температуре 4 °С — 21 сутки, при 20 °С — не менее 12 недель. В инфицированных тканях кампилобактерии выживают до года. Однако, бактерии рода *Campylobacter* чувствительны к антибиотикам и дезинфицирующим средствам, а также к воздействию ультрафиолетовых лучей [10, 11].

По последним данным бактерии рода *Campylobacter* встречаются не только у птицы, но и почти всех теплокровных животных: крупный рогатый скот, свиньи, овцы, страусы, домашние животные (кошки, собаки). Путь передачи возбудителя кампилобактериоза чаще всего алиментарный. Дикие и перелетные птицы при испражнении кишечника инфицируют природные объекты. Заражение других животных происходит при поедании зараженной растительности. Среди домашнего скота достаточно широко распространен венерический путь передачи, со спермой зараженного самца. Локализируются кампилобактерии в основном в кишечнике, репродуктивных органах и в лимфатической системе [5, 12, 13, 14].

Учитывая патогенность кампилобактерий и характер заболевания людей в пищевой микробиологии используются различные подходы для обнаружения бактерий рода *Campylobacter* в объектах пищевой цепи человека и животных. Прежде всего, это классические методы микробиологической практики, которые описаны в ISO 10272-1:2006(en) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* — Part 1: Detection method, с учетом изменений внесенных в 2017 году. С момента публикации при определении кампилобактерий необходимо будет использовать ISO 10272-1:2017(en) Microbiology of the

food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* — Part 1: Detection method [15]. Количественный и полуколичественный учет осуществляется по ISO 10272-2:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* — Part 2: Colony-count technique (Микробиология пищевой цепи — Горизонтальный метод обнаружения и подсчета *Campylobacter spp.* — Часть 2: Метод подсчета колоний), ISO/TS10272-3:2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* — Part 3: Semi-quantitative method (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных — Горизонтальный метод обнаружения и перечисления *Campylobacter spp.* — Часть 3: Полуколичественный метод). В России выявление и определение количества бактерий рода *Campylobacter* проводят в соответствии с тремя микробиологическими ГОСТами: ГОСТ ISO 10272-1-2013, ГОСТ ISO/TS10272-2-2013 и ГОСТ Р 55027-2012/ISO/TS10272-3:2010. Кроме классических методов, для обнаружения кампилобактерий используют и альтернативные (быстрые) методы, например ПЦР-анализ в реальном времени и иммунохроматографические экспресс-тесты.

Анализ литературных источников показал, что научный интерес заостряется на определении и идентификации кампилобактерий в птице. В среднем на эти исследования приходится 98,3–99,5% от общего числа исследований на кампилобактерии среди убойных животных. Причем более трети из них в последние годы проводились с применением ПЦР (Рис. 1). Исследований мяса убойных животных, за исключением птицы, на наличие кампилобактерий практически не проводились. Вероятнее всего на это повлиял низкий уровень выявляемости *Campylobacter spp.* в красном мясе, что может быть объяснимо разными подходами к отбору проб и пробоподготовки при исследовании мяса птицы и всех остальных убойных животных. Отбор проб и пробоподготовку мяса и мясной продукции проводят в соответствии с ISO 6887-2 из глубоких слоев и/или с поверхности. При этом отбор глубоких слоев осуществляют после обеззараживания поверхности объекта исследования. Все мясо убойных животных на патогенные микроорганизмы отбирается именно так. Как было сказано выше, бактерии рода *Campylobacter* не локализуются в мышечных тканях, а контаминируют ее при нутровке. В связи с этим отбор проб мяса должен осуществляться с не обеззараженной поверхности. Однако исследования мяса птицы в основном осуществлялся путем взятия смывов или ополаскиванием, что и способствовало высокой выявляемости искомого патогена.

Несмотря на очевидную необходимость ужесточения контроля *Campylobacter spp.* на предприятиях мясоперерабатывающей отрасли, диагностирование

кампилобактерий затруднительно. Это связано с их прихотливостью. Являясь капнофильными микроаэробными микроорганизмами, для роста и развития они требуют создания модифицированной газовой среды, с повышенным содержанием углекислого газа и сниженной концентрацией кислорода. Кроме этого, для наращивания биомассы необходимы специализированные питательные среды такие как, например, бульон Престона (Preston broth) или бульон Болтона (Bolton broth) на этапе предварительного обогащения и специализированные агаризованные среды (Мюллера-Хинтона агар, Угольный агар), для выявления *Campylobacter fetus* необходимы среды с использованием дебибрированной крови, такие как колумбийский агар с кровью. Это все делает анализ на выявление кампилобактерий материальнозатратным, длительным и сложным в исполнении.

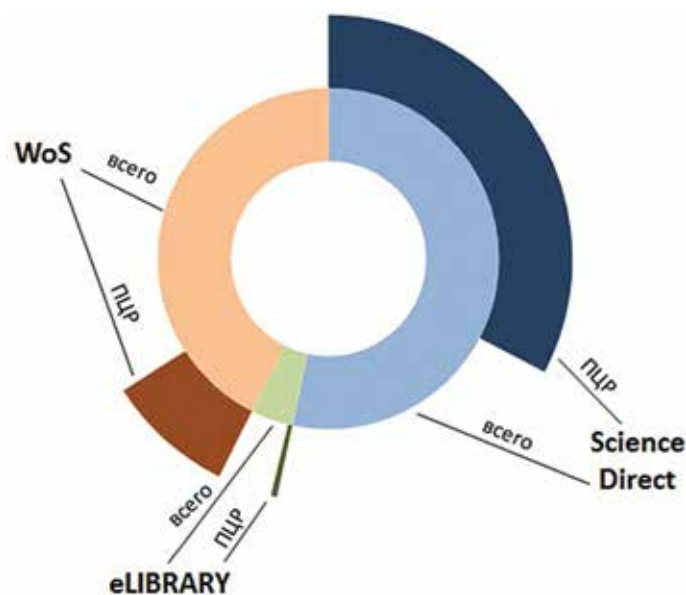


Рис. 1. Анализ публикационной активности по проблематике *Campylobacter* в международных базах цитирования за последние 10 лет

Наиболее перспективным методом для выявления кампилобактерий является ПЦР. В настоящее время при контроле бактерий рода *Campylobacter* методом ПЦР необходимо пользоваться методикой, описанной в МУК 4.2.2872-11. Преимущество методики заключается в отсутствии необходимости селекции и изоляции *Campylobacter* из пула микроорганизмов. Недостатком методики являлось отсутствие готовой к использованию тест-системы ПЦР для выявления *Campylobacter*.

Целью нашей работы являлась разработка полноценной ПЦР тест-системы для выявления бактерий рода *Campylobacter* в пищевой продукции.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись тест-штаммы чистых культур патогенных микроорганизмов: *Campylobacter jejuni subspecies jejuni* 70.2T; *Salmonella enteri-*

ca subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC14028; Escherichia coli ATCC 25922; Proteus mirabilis ATCC35659; Aeromonas salmonicidaas1; образцы птицы («А», «В», «С») предположительно обсемененные бактериями рода *Campylobacter*; продукты амплификации штаммов; выделенные ДНК штаммов микроорганизмов.

При проведении исследования использовали микробиологический метод обнаружения бактерий рода *Campylobacter* согласно ИСО 10272:1. Первичное обогащение проводили в селективной жидкой среде Bolton broth (CM 0983, OXOID) в две стадии. Первую стадию инкубирования проводили при температуре $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 4–6 ч, на второй стадии — при температуре $(41,5 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение (44 ± 4) ч. После чего производили пересев на плотные селективные питательные среды (Preston agar и mCCD agar) и культивировали при температуре $(41,5 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 44 ± 4 ч в условиях модифицированной газовой атмосферы. Для создания модифицированной газовой атмосферы применяли коммерческие газогенераторы.

В результате культивирования получали изолированные колонии, которые идентифицировали с использованием коммерческих тест-систем api (Biomerieux, Франция).

Для проведения ПЦР, культуральную жидкость, полученную на этапе первичного обогащения использовали для получения биомассы клеток микроорганизмов и последующего выделения из нее ДНК. Для этого отбирали культуральную жидкость объемом $1,0 \text{ см}^3$ в стерильные центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 5 мин при 6,5 тыс. оборотах (Eppendorf). Полученный супернатант удаляли, получая концентрат биомассы. Принимая во внимание, что в концентрате могут находиться компоненты питательной среды, полученные образцы биомассы подвергали промывке. Для этого к декантанту добавляли стерильный физиологический раствор, суспендировали встряхиванием, после чего повторно центрифугировали при тех же режимах. Из полученного, после слива промывного физиологического раствора, концентрата выделяли ДНК.

Так же для проведения ПЦР проводили отбор типичных колоний с агаризованных селективных сред и готовили суспензию микроорганизмов с заданным титром в стерильном физиологическом растворе. Для определения титра микроорганизмов применяли ме-

тод сравнения со стандартом мутности № 1 McFarland (Biomerieux, Франция), эквивалентным, 3×10^8 бактериальных клеток в 1 см^3 суспензии. Полученную суспензию центрифугировали, получая концентрат биомассы микроорганизмов. Из полученного концентрата выделяли ДНК.

Согласно литературному поиску, бактерии рода *Campylobacter* способны взаимодействовать по принципу комменсализма или находится в консорциуме кишечного микробиома с другими патогенными микроорганизмами. В связи с этим при анализе генома *Campylobacter* проводили сравнение с бактериями родов *Escherichia*, *Salmonella*. Для проведения ПЦР в отношении этих микроорганизмов музейные культуры были рекультивированы на плотной питательной среде Trypton-soya agar (TSA), после чего создавали суспензию клеток с заданным титром в физиологическом растворе методом аналогичным тому, который использовали для получения суспензии клеток *Campylobacter*.

Для выделения ДНК подготавливали суспензию клеток объемом 50 мкл. Выделение ДНК проводили методом магнитных частиц на роботизированной станции MagNA Pure LC2.0 Instrument (Roche, Швейцария), используя набор для выделения ДНК MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Roche, Швейцария).

Анализ генома и согласование дизайна комплиментарных праймеров к *Campylobacter* осуществляли с помощью программ Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и Oligo Analyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Для получения фрагментов ДНК использованы универсальные праймеры (Табл. 1) и родоспецифичные праймеры (Табл. 2.) к гену 16S rDNA.

Выбранные родоспецифичные праймеры к гену 16S rDNA бактерий рода *Campylobacter* были использованы для проведения ПЦР в реальном времени. Условия и режимы проведения ПЦР реакции приведены в Табл. 3. Температуру плавления определяли *in silico* с применением интерактивной программы uMELTSM (<https://dna.utah.edu/umelt/um.php>).

Чистоту полученных ПЦР-продуктов (ампликонов) проверяли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле с использованием TBE — буфера (Thermo Scientific, США). Для окрашивания ПЦР-продуктов использовали краситель SYBRGreen I (Силекс, Россия). Объем вносимого образца в каждую из трех лунок геля

Таблица 1. 16S rDNA праймеры, использованные для получения фрагментов ДНК бактерий рода *Campylobacter*

Forward primer	TACGGGAGGCAGCAG	Plus	15	2	16	54.37	66.67	3.00	2.00
Reverse primer	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	Minus	20	566	547	54.11	40.00	4.00	0.00
Product length	565								

Таблица 2. Родоспецифичные праймеры к гену 16S rDNA бактерий рода *Campylobacter*, использованные для проведения ПЦР в реальном времени:

Forward primer	GTTAAGTCCCGCAACGAGC	Plus	19	463	481	59.21	57.89	4.00	2.00
Reverse primer	GGCTGATCTACGATTAAGCGA	Minus	23	735	713	59.56	47.83	4.00	2.00
Product length	273								

составлял 15 мкл. Для индукции излучения флуоресцирующего света из красителя использовали трансиллюминатор ЕТХ-F26 (Vilber Lourmat, Франция).

Таблица 3. Условия и режимы проведения ПЦР

При наработке ПЦР фрагментов для дальнейшего секвенирования:			
Состав реакционной смеси:		Условия ПЦР	
Q5 ПЦР буфер×2,0	12,5 мкл	98	120
Вода	7 мкл	Денатурация	
Prmix	3 мкл	54	30
ДНК	2 мкл	72	20
Eva-green краситель	0,5 мкл	98	15
30 циклов			
При проведении ПЦР в реальном времени:			
Состав реакционной смеси:		Условия ПЦР	
PC×2,5	10 мкл	95	400
Вода	15 мкл	60	40
Prmix	3 мкл	95	15
ДНК	2 мкл	40 циклов	
Eva-green краситель	0,4 мкл		
Taq-полимераза	0,4 мкл		

Для первичной очистки фрагментов ДНК использовали набор Cleanup Standart (Евроген, Россия). Для этого на колонку наносили не более 200 мг агарозного геля и проводили очистку в соответствии с рекомендациями производителя согласно инструкции к набору с некоторыми изменениями. Для настоящего исследования было увеличено время центрифугирования на всех этапах с 30 с на 60 с; элюирующий раствор предварительно нагревали до 55 °С; после первичного добавления элюирующего буфера образцы выдерживали 5 мин. В результате получали три пробы равного объема, которые объединяли. Общий объем объединенной пробы составил 600 мкл.

Вторую стадию колоночной очистки проводили с помощью набора MinElute Purification Kit (Qiagen, США) согласно протоколу. В колонку вносили 600 мкл образца, полученного после первичной очистки. Объем элюирующего буфера, вносимого на мембрану на второй стадии очистки, был увеличен, и составил 15 мкл.

Определение концентрации очищенных ПЦР-продуктов проводили фотометрическим методом с использованием фотометра Qubit 3.0 (Thermo Scientific, США) согласно протоколу к набору Qubit dsDNA HS Assay Kits (Thermo Scientific, США).

Результаты и обсуждение

Для генотипирования контрольного штамма *Campylobacter jejuni subspecies jejuni 70.2T* была выделена его ДНК и поставлена ПЦР с выбранными универсальными праймерами к гену 16S РНК прокариот. Сходимость выбранных форвард и реверс праймеров представлена на Рис. 2 и Рис. 3.

Из данных представленных на Рис. 2 и Рис. 3 видно, что форвард праймер обладает 100 % сходимостью с *Campylobacter*, а реверс праймер имеет сходимость на 95 %. В связи с тем, что реверс праймер не дает полную сходимость с *Campylobacter* был проанализирован системный мисматч участка несходимости. Результаты представлены на Рис. 4.

Расположение мисматча в 5' области праймера позволило использовать универсальные праймеры для получения продуктов амплификации для секвенирования.

В результате секвенирования, проведенного совместно с ЗАО «Евроген», очищенных фрагментов ДНК штамма *Campylobacter jejuni subspecies jejuni 70.2T*, была установлена его нуклеотидная последовательность

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Campylobacter sputorum strain RM8705, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019685.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter sputorum by paraureticus LMG 11764 strain LMG 17589, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019684.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter sputorum by faecalis CCLUG 20703, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019683.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter sputorum by sputorum RM3237, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019682.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter jejuni strain FORC_045, complete genome	30.2	112	100%	0.57	100%	CP017229.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter jejuni strain 11643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372576.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter jejuni strain 11657 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372575.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter jejuni strain 11024 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372574.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter jejuni strain 11044 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372573.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter jejuni strain 13775 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372572.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter jejuni subsp. jejuni strain FDAARGOS_265, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP022079.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter jejuni subsp. jejuni strain FDAARGOS_262, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP022076.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter jejuni subsp. jejuni strain ATCC 35925, complete genome	30.2	114	100%	0.57	100%	CP020045.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter jejuni strain NCTC12852, complete genome	30.2	114	100%	0.57	100%	CP019985.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter coli strain aerotolerant OR12, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019977.1
<input type="checkbox"/> Campylobacter pinnipediorum subsp. pinnipediorum strain RM17262, complete genome	30.2	111	100%	0.57	100%	CP012548.1

Рис. 2. Оценка специфичности форвард праймера для секвенирования

Для расчета чувствительности и эффективности ПЦР реакции с родоспецифичными праймерами была проведена ПЦР с использованием ряда десятикратных разведений ДНК. Результаты чувствительности праймеров представлены на Рис. 7.

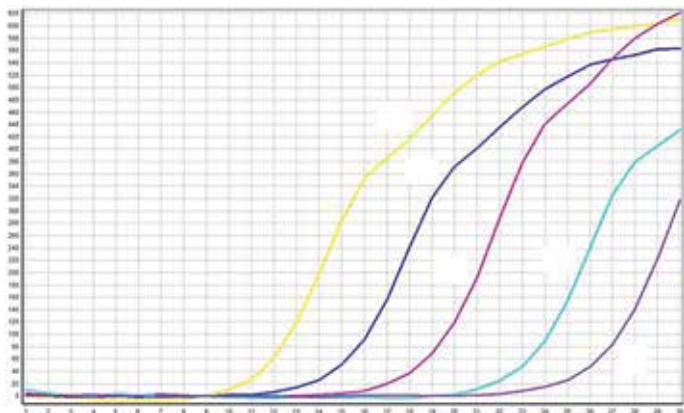


Рис. 7. Результаты чувствительности родоспецифических праймеров для *Campylobacter*

Проанализировав данные представленные на Рис. 7, пятое разведение ДНК было принято за нижший предел обнаружения метода ПЦР, эквивалентной 1×10^4 бактериальных клеток в 1 см^3 суспензии.

Полученные результаты ПЦР в реальном времени коррелируют с расчетными данными и подтверждают 100 %-ную специфичность подобранных праймеров к бактериям рода *Campylobacter*. Эффективность ПЦР составляет не менее 95 % (Рис. 8).

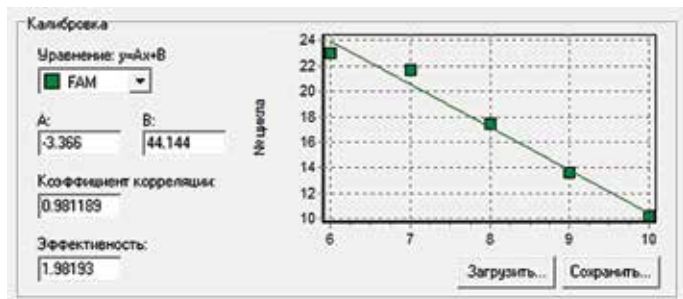


Рис. 8. Кривая расчетной эффективности ПЦР реакции

Для определения уникальности ПЦР реакции проведена серия сравнительных экспериментов с применением микроорганизмов, которые могут обнаруживаться в пробах наряду с *Campylobacter* (Рис. 9). Наиболее часто встречаются ассоциаты микробиома кампилобактерий с бактериями родов *Salmonella* и *Escherichia*. В связи с этим представляло интерес провести ПЦР исследование с выбранными родоспецифичными праймерами в отношении бактерий родов *Salmonella* и *Escherichia*

Анализ данных, полученных в результате ПЦР (Рис. 9) показал, что выбранные праймеры дают положительную реакцию на бактерии родов *Salmonella* и *Escherichia*. Следовательно, специфичность реакции при использовании данных праймеров не подтвердилась.

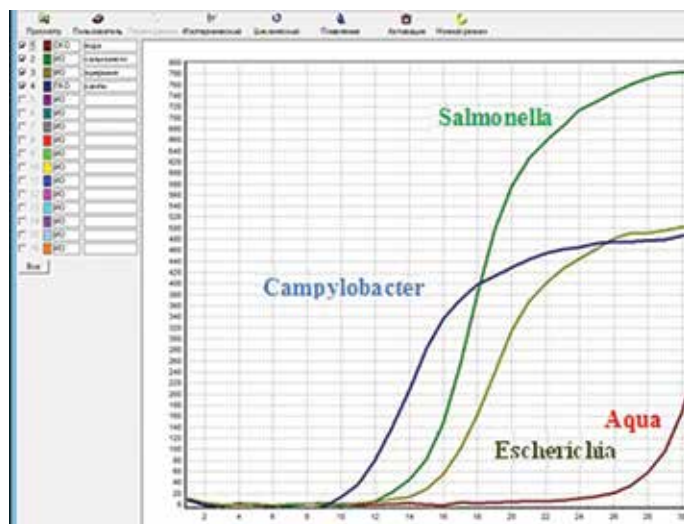


Рис. 9. Результаты ПЦР исследования с применением универсальных родоспецифичных праймеров

Для подбора специфичных праймеров, участок 16S ДНК *Campylobacter* был выровнен на гомологичные участки 16S ДНК бактерий родов *Salmonella*, *Escherichia* и *Aeromonas* (Рис. 10).

В результате выравнивания было установлено, что реверс праймер имеет всего два мисматча в отношении гомологичных участков ДНК бактерий, расположенных в 5' области праймера. Данная последовательность не обладает должной специфичностью, в связи с чем, при её использовании тест-система будет давать ложноположительной реакции.

Во избежание получения ложноположительной реакции, было принято решение сдвинуть область комплементарного связывания праймера по 3' области с позиции 1338 на 16 базовых пар нуклеотидов в позицию 1322 (Рис. 11).

Из представленных данных видно, что новый реверс праймер имеет 3 мисматча в отношении гомологичных участков ДНК бактерий *Salmonella*, *Escherichia* и *Aeromonas*, расположенных в 3' области праймера, отвечающей за специфичный отжиг.

Для подтверждения специфичности ПЦР реакции с новыми подобранными праймерами после выравнивания гомологичных участков ДНК была проведена постановка ПЦР с бактериями родов *Salmonella*, *Escherichia* и *Campylobacter* (Рис. 12).

Отмечено, что новые подобранные праймеры обладают специфичностью по отношению к бактериям рода *Salmonella* и *Escherichia*. Полученные результаты амплификации позволяют утверждать, что использование новых подобранных праймеров исключает ошибку диагностики при дифференциации рода *Campylobacter* от бактерий родов *Salmonella* и *Escherichia*.

Принимая во внимание, что *Campylobacter* может встречаться в смешанной культуре с бактериями родов *Proteus* и *Aeromonas*, была проведена сравнительная межродовая диагностика путем постановки ПЦР с выбранными праймерами (Рис. 13).

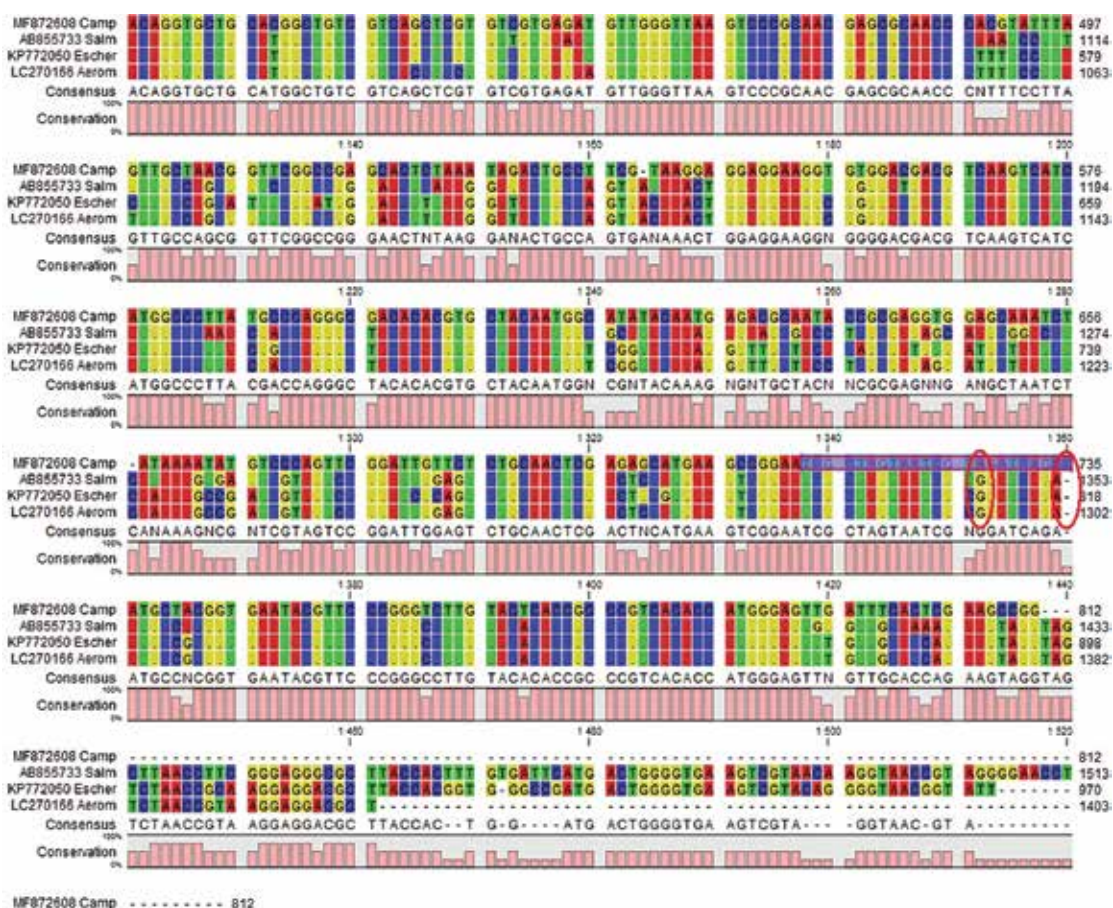


Рис. 10. Выравнивание гомологичных участков ДНК бактерий родов *Salmonella*, *Escherichia*, *Aeromonas* и *Campylobacter* содержащих участок отжига универсального реверс праймера

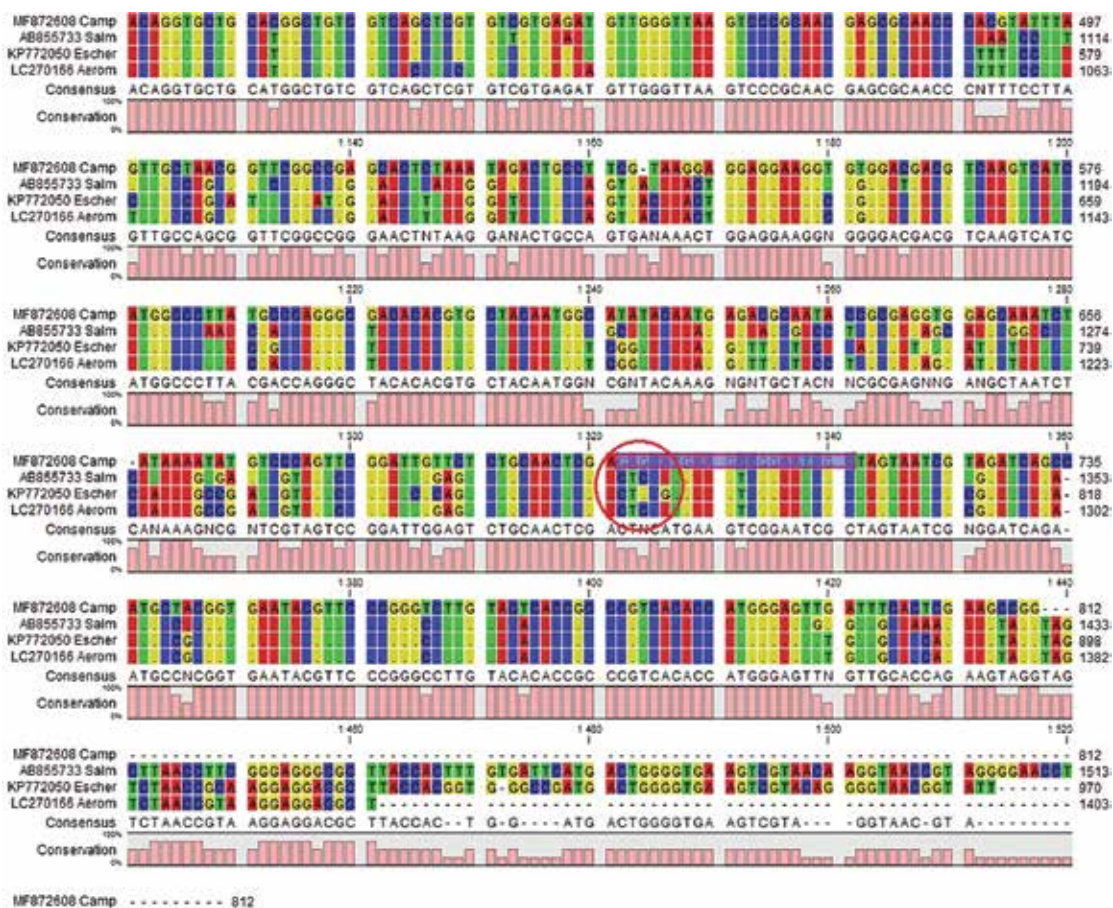


Рис. 11. Выравнивание гомологичных участков ДНК бактерий родов *Salmonella*, *Escherichia*, *Aeromonas* и *Campylobacter* содержащих участок отжига реверс праймера

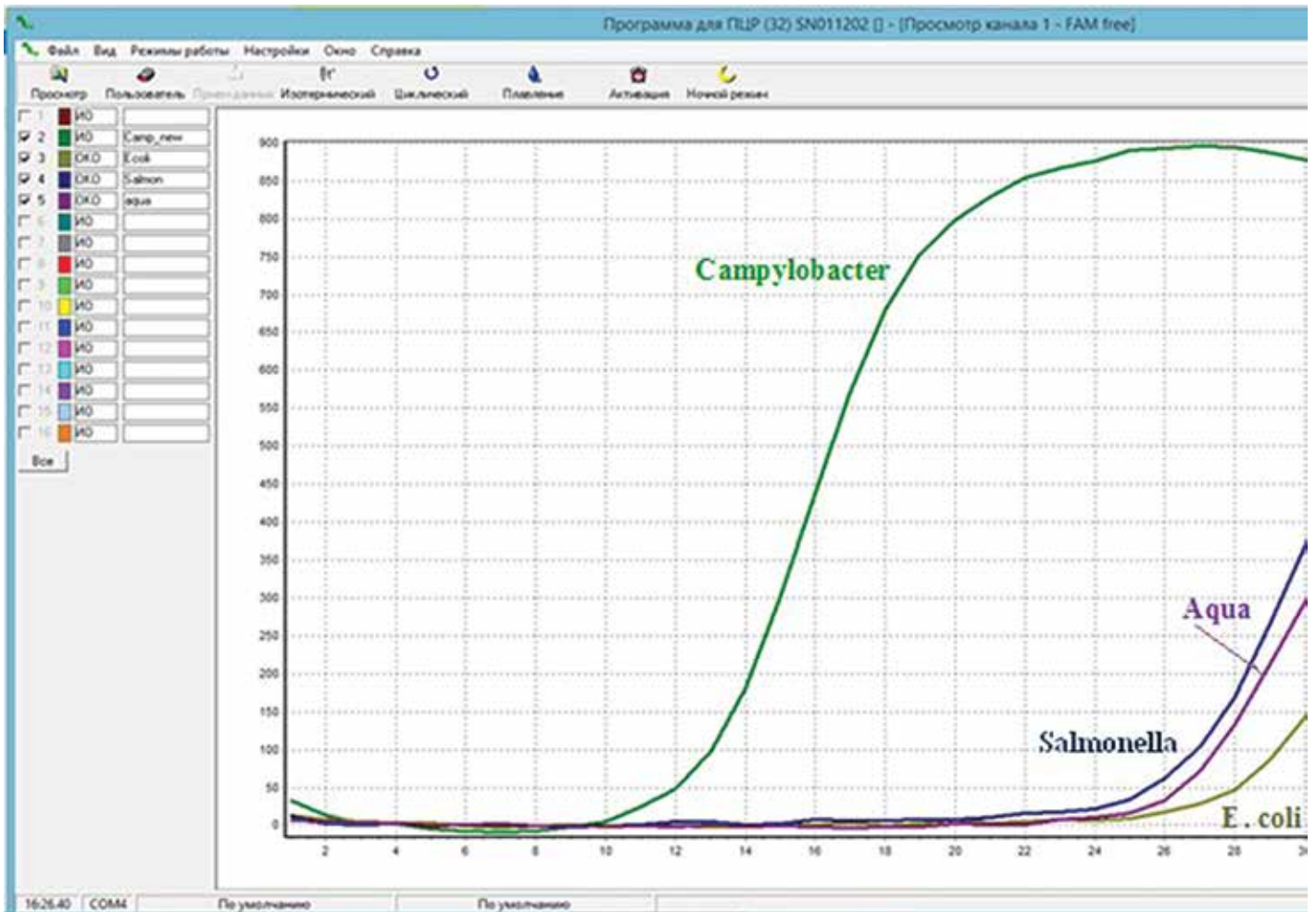


Рис. 12. Результаты амплификации *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* и *Escherichia coli*

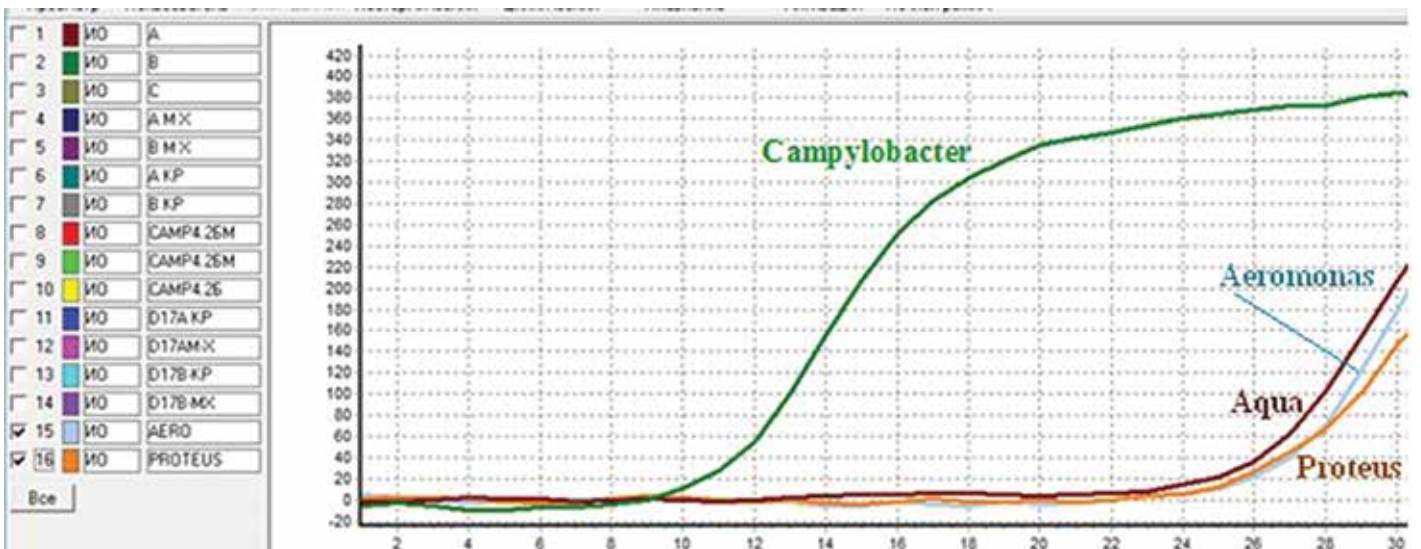


Рис. 13. Результаты амплификации *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas salmonicida* и *Proteus mirabilis*

Данные представленные на рисунке, доказывают, что выбранные праймеры обладают высокой специфичностью в отношении бактерий рода *Aeromonas* и *Proteus*.

Для оценки диагностических возможностей разработанной ПЦР тест-системы была проведена серия сличительных испытаний с традиционным микробиологическим методом выявления бактерий рода *Campylobacter*.

Как видно из данных ПЦР исследования, представленных на Рис. 14, только проба «В» дала положительную реакцию амплификации, что свидетельствует о наличии в ней бактерий рода *Campylobacter*. Пробы «А» и «С» дали отрицательную реакцию при проведении ПЦР, что подтверждает отсутствие *Campylobacter spp.*

Параллельно с ПЦР-анализом было проведено исследование проб «А», «В» и «С» культуральным мето-

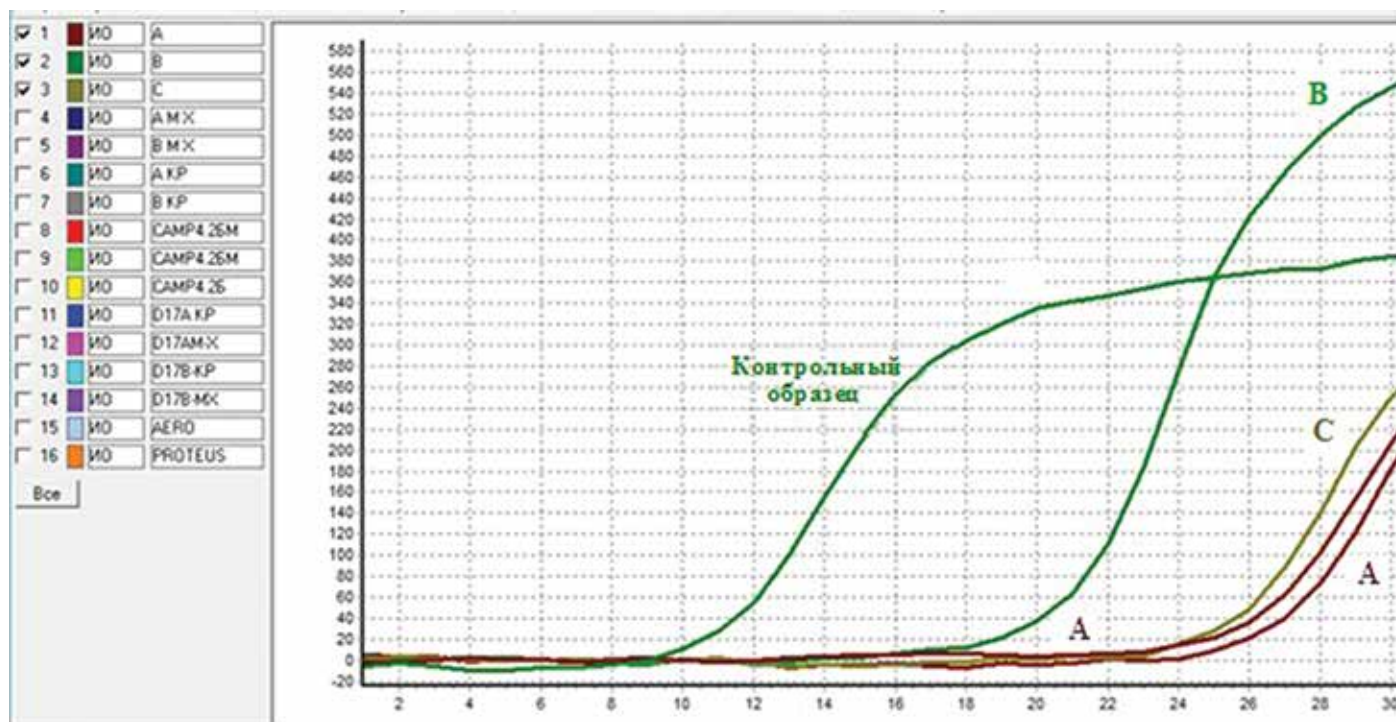


Рис. 14. Кривые амплификации *Campylobacter jejuni* (положительный контроль) и зашифрованных образцов «А», «В» и «С»

дом. В результате культивирования этих проб и последующей биохимической идентификации, бактерии рода *Campylobacter* были обнаружены только в пробе «В».

Результаты, полученные при проведении сравнительных испытаний разными методами, показали полную сходимость культурального и ПЦР метода, что позволяет использовать разработанную ПЦР тест-систему в лабораторной практике.

Выводы

В результате проведенных исследований были отработаны подходы к выбору генов-мишеней, обладающих разрешающей способностью в пределах рода *Campylobacter*. Были изучены характеристики

праймеров для определения кампилобактерий, в результате чего были подобраны родоспецифичные праймеры к бактериям рода *Campylobacter* на основе которых была разработана готовая к применению ПЦР тест-система для выявления *Campylobacter* spp. Была проведена оценка специфичности, точности и эффективности проводимой ПЦР. Разработанная тест-система была верифицирована в раунде международных сравнительных испытаний FEPAS. Установлено, что данная тест-система может быть использована для экспресс диагностики бактерий рода *Campylobacter* в мясе убойных животных. Полученные результаты подтверждены микробиологическим референс-методом.

Introduction

Progressing mutagenesis in pathogenic microorganisms of food origin is of serious pandemic hazard to modern world. Showing rapid variability, both at the genetic and phenotypic levels, pathogens become resistant to various factors including environmental ones. This leads to expansion of their distribution area.

A number of microorganisms are currently the most dangerous ones due to their wide distribution in nature, high survival and pathogenicity. Such microorganisms include the family of capnophilic epsilon-proteobacteria, *Campylobacterales*, in particular bacteria of *Campylobacter* and *Helicobacter* genera [1].

In addition, the World Health Organization identifies several most dangerous pathogenic microorganisms in terms of increasing resistance including bacteria of *Campylobacter* genus [2].

The WHO report «Global Look at Campylobacteriosis» noted that campylobacteriosis is an underestimated disease. The frequency of infection with pathogenic agent of this disease is growing rapidly in the population. The report identifies two species, *C. jejuni* and *C. coli*, as the most dangerous ones, despite the fact that twelve out of 16 *Campylobacter* species are considered pathogenic [3, 4].

Bacteria of *Campylobacter* genus are regarded worldwide as the most common food pathogens that cause campylobacteriosis (vibriosis) with the following pathogenesis: intestinal infections, enteritis, bacteremia, colitis, septic arthritis, hemolytic-uremic syndrome. In complicated cases, they may cause Reiter's syndrome or Guillain-Barre syndrome. In some cases, a lethal outcome is possible, mainly in the populations at risk because of weakened immunity. According to the WHO newsletter, usually the source of

infection and the cause of gastroenteritis is poultry meat that has undergone insufficient heat treatment [5].

In 2007, international Codex Alimentarius Commission (CAC) и Codex Committee on Food Hygiene stated the need for more careful study and control of *Salmonella* and *Campylobacter* genera bacteria [6, 7].

Studies of 148 food samples (lettuce, vegetables, raw milk, chicken meat, chicken raw by-products, turkey, quail, beef and washouts from various surfaces) carried out by «FIC of nutrition and biotechnology» detected their contamination and identified 50 strains of *Campylobacter* genus bacteria, most of which were represented by *C. jejuni* species. Most often, campylobacteria present in food due to contamination including contamination from the surface of the main and additional equipment. *Campylobacter jejuni* is the most pathogenic representative of the genus because of wide-range drug resistance to antimicrobial drugs including quinolones [8, 9].

Taking into account that birds (especially migratory birds) may be the carriers of campylobacteria, the dissemination of this pathogen among animals is rapid and difficult to control [4].

In connection with the zoonotic nature of the pathogen and widespread prevalence, the risk factor for campylobacteria infection persists at any meat processing plant, especially at poultry processing plants. It is also important to consider the resistance of these bacteria to environmental conditions. Campylobacteria can survive in a wide temperature range of 4 to 43°C. Because of this property, they are referred to as thermotolerant microorganisms. In wet natural objects (water, manure, soil, hay, etc.) at a temperature of 18–27°C, *Campylobacter* survive for more than a month. In products of animal origin at a temperature of 4°C, *Campylobacter* survive for 21 days, and at 20°C for at least 12 weeks. In infected tissues, campylobacteria survive up to a year. However, the bacteria of *Campylobacter* genus are susceptible to antibiotics and disinfectants, as well as to exposure to ultraviolet rays [10, 11].

According to the latest information, bacteria of *Campylobacter* genus are found not only in birds, but also in almost all warm-blooded animals: cattle, pigs, sheep, ostriches, domestic animals (cats, dogs). The path of transmission of campylobacteriosis causing pathogen is most often alimentary. Wild and migratory birds infect natural objects during defecation. Infection of other animals occurs when eating contaminated vegetation. Among livestock, the venereal transmission with the sperm of infected male is fairly widespread. Campylobacteria are distributed mainly in the intestines, reproductive organs and in lymphatic system [5, 12, 13, 14].

Considering the pathogenicity of campylobacteria and the nature of human disease, food microbiology uses different approaches to detect bacteria of *Campylobacter* genus in food and animal feed chain objects. First of all, these are the classical methods of microbiological practice, which are described in ISO 10272–1:2006 (en) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for

detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method, with changes made in 2017. Soon, when determining campylobacteria, it will be necessary to use ISO 10272–1:2017 (en) Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method [15], when it will be published. Quantitative and semi-quantitative determination is carried out according to ISO 10272–2:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 2: Colony-count technique, ISO/TS10272–3:2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 3: Semi-quantitative method. In Russia, the detection and quantification of *Campylobacter* genus bacteria is carried out in accordance with three microbiological GOSTs: GOST ISO 10272–1–2013, GOST ISO/TS10272–2–2013 and GOST R55027–2012/ISO/TS10272–3:2010. In addition to traditional methods of campylobacteria detection, alternative (rapid) methods are used, for example real-time PCR analysis and immunochromatographic rapid tests.

Literature analysis showed that scientific interest was focused on determination and identification of campylobacteria in poultry. On average, these studies account for 98.3–99.5% of the total number of studies on campylobacteria among slaughter animals. And more than a third of them, in recent years, have been carried out using PCR (Figure 1). Studies of slaughter animal meat concerning the presence of campylobacteria almost were not carried out (with the exception of poultry). Most likely this was due to the low detection rate of *Campylobacter* spp. in red meat, which can be explained by different approaches to sampling and sample preparation in the studies of poultry and all other slaughter animals. Sampling and sample preparation of meat and meat products are carried out in accordance with ISO 6887–2 from deep layers and/or from surface. In this case, the collection of deep layers is carried

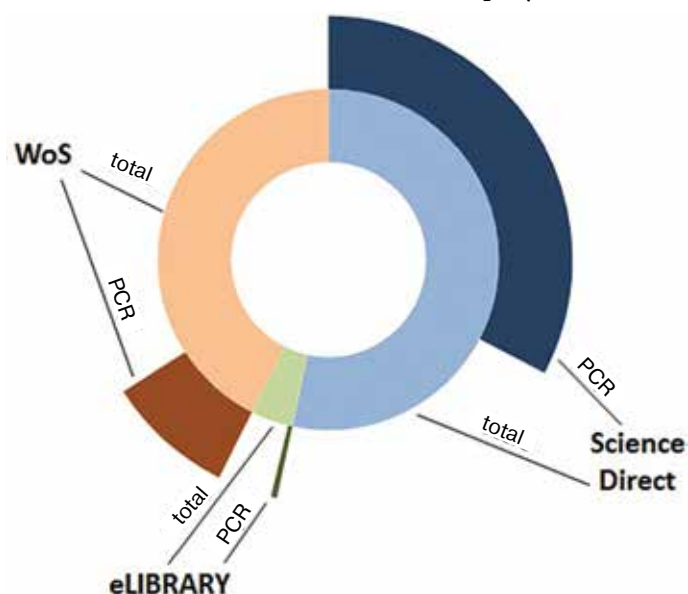


Figure 1. Analysis of publications concerning the problems of *Campylobacter* in international citation databases for the last 10 years

out after disinfection of the surface of investigation object. All the meat of slaughter animals intended for pathogenic microorganism testing is collected this way. As it was indicated above, the bacteria of *Campylobacter* genus are not distributed in the muscle tissues, and contaminate it during evisceration. Thus, meat sampling should be carried out from non-disinfected surface. However, poultry meat studies were mainly carried out using washouts, which contributed to the high detection of the target pathogen.

Despite the obvious need for stricter control of *Campylobacter* spp. at the enterprises in meat-processing industry, the determination of campylobacteria is difficult. This is due to their fastidious nature. They are capnophilic micro-aerobic microorganisms; for growth and development they require the creation of modified atmosphere with a high content of carbon dioxide and a reduced concentration of oxygen. In addition, specialized nutrient media, such as Preston broth or Bolton broth, in the pre-enrichment stage, and specialized agar medium (Mueller-Hinton agar, Coal agar) are needed for biomass gain. To identify *Campylobacter fetus*, media with de-buffered blood are needed, such as Colombian blood agar. It makes the identification of campylobacteria material-consuming, time-consuming and difficult to perform.

The most promising method for identifying campylobacteria is PCR. Currently, when controlling bacteria of *Campylobacter* genus by PCR, it is necessary to use the technique described in MUK 4.2.2872-11. The advantage of the technique is the absence of the need for selection and isolation of *Campylobacter* from a pool of microorganisms. The disadvantage of the technique is a lack of ready-to-use PCR test system for *Campylobacter* detection.

The purpose of this work was to develop a complete PCR test system for the detection of *Campylobacter* genus bacteria in food products.

Materials and methods

The study objects were pure culture strains of pathogenic microorganisms: *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* 70.2T; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC14028; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Proteus mirabilis* ATCC35659; *Aeromonas salmonicida*; poultry samples («A», «B», «C») presumably contaminated with bacteria of *Campylobacter* genus; products of strain amplification; isolated DNA of microbial strains.

The study used a microbiological method for the detection of *Campylobacter* genus bacteria according to ISO 10272:1. Primary enrichment was carried out in a selective liquid medium, Bolton broth (CM 0983, OXOID), in two stages. The first stage of incubation was carried out at a temperature of $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ for 4–6 hours and the second stage at a temperature of $(41.5 \pm 2)^\circ\text{C}$ during (44 ± 4) h. After that, inoculation into selective culture media (Preston agar and mCCD agar) and incubation at a temperature of $(41.5 \pm 2)^\circ\text{C}$ for 44 ± 4 h were carried out under the modified atmosphere conditions. To create modified atmosphere, commercial gas generators were used.

As a result of incubation, isolated colonies were obtained, which were identified using api commercial test systems (Biomerieux, France).

For PCR, the culture fluid obtained in the primary enrichment step was used to obtain biomass of the microorganism cells and subsequent isolation of DNA. For this, a 1.0 cm³ of culture liquid was transferred into sterile centrifuge tubes and centrifuged for 5 minutes at 6,500 rpm (Eppendorf). The resulting supernatant was removed to obtain biomass concentrate. Taking into account that the components of the nutrient medium may be present in the concentrate, the obtained biomass samples were subjected to washing. Therefore, a sterile saline solution was added to the decantate, suspended by shaking, and then re-centrifuged under the same conditions. DNA was isolated from the obtained concentrate after draining the washing saline solution.

For PCR, typical colonies were also selected from selective agar media and a suspension of microorganisms with a given titer in a sterile saline solution were prepared. To determine the titer of microorganisms, the method of comparison with McFarland turbidity standard No. 1 (Biomerieux, France, equivalent to 3×10^8 bacterial cells per 1 cm³ of suspension) was used. The resulting suspension was centrifuged to obtain biomass concentrate. DNA was isolated from the resulting concentrate.

According to a literature search, the bacteria of *Campylobacter* genus are able to interact in accordance with commensalism principle or are in consortium of intestinal microbiome with other pathogenic microorganisms. In this connection, during the analysis of *Campylobacter* genome, a comparison was made with the bacteria of *Escherichia* and *Salmonella* genera. To carry out PCR for these microorganisms, the museum cultures were re-cultured on a solid nutrient medium, Trypton-soya agar (TSA), and cell suspension with a given titer in saline solution was prepared by the method similar to that used to prepare a suspension of *Campylobacter* cells.

For DNA isolation, 50 µl of cell suspension was prepared. DNA extraction was performed by magnetic particles method on MagNA Pure LC2.0 Instrument (Roche, Switzerland) using MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Roche, Switzerland).

Genome analysis and matching of the design of complementary primers to *Campylobacter* were performed using Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) and Oligo Analyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) software.

To obtain DNA fragments, universal primers (Table 1) and gene-specific primers (Table 2) to 16S rDNA gene were used.

Selected gene-specific primers to the 16S rDNA gene of *Campylobacter* genus bacteria were used for real-time PCR. The conditions and modes of PCR reaction are given in Table 3. The melting point was determined in silico using interactive program uMELTSM (<https://dna.utah.edu/umelt/um.php>).

Table 1. 16S rDNA primers used to obtain DNA fragments of *Campylobacter* genus bacteria

Forward primer	TACGGGAGGCAGCAG	Plus	15	2	16	54.37	66.67	3.00	2.00
Reverse primer	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	Minus	20	566	547	54.11	40.00	4.00	0.00
Product length	565								

Table 2. Gene-specific primers to 16S rDNA gene of *Campylobacter* genus bacteria used for real-time PCR:

Forward primer	GTTAAGTCCCACAACGAGC	Plus	19	463	481	59.21	57.89	4.00	2.00
Reverse primer	GGCTGATCTACGATTACTAGCGA	Minus	23	735	713	59.56	47.83	4.00	2.00
Product length	273								

The purity of the obtained PCR products (amplicons) was checked by electrophoresis in a 2% agarose gel using TBE buffer (Thermo Scientific, USA). To stain the PCR products, SYBRGreen I stain (Sileks, Russia) was used. The volume of the sample added to each of the three gel wells was 15 µl. For the induction of fluorescent light from the stain, ETX-F26 transilluminator (Vilber Lourmat, France) was used.

For the primary purification of DNA fragments, Cleanup Standard kit (Eurogen, Russia) was used. For this, 200 mg or less of agarose gel was applied to the column and purification was carried out according to the manufacturer's recommendations and kit instructions, with some modifications. In this study, the centrifugation time was increased at all stages from 30 to 60 seconds; the eluting solution was preheated to 55°C; after the initial addition of the elution buffer, the samples were aged for 5 minutes. As a result, three samples of equal volume were obtained, which were pooled. The total volume of the pooled sample was 600 µl.

The second stage of column purification was carried out using MinElute Purification Kit (Qiagen, USA) according to the protocol. 600 µl of the sample obtained after the initial purification was added to the column. The volume of the eluting buffer added to the membrane in the second purification step was increased to 15 µl.

The concentration of purified PCR products was determined by photometric method using Qubit 3.0 photometer (Thermo Scientific, USA) according to the Qubit dsDNA HS Assay Kits protocol (Thermo Scientific, USA).

Results and discussion

To genotype the control strain, *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* 70.2T, its DNA was isolated and PCR reaction was carried out with the selected universal primers to 16S prokaryotic RNA gene. The convergence of the selected forward and reverse primers is shown in Figure 2 and Figure 3.

Data presented in Figure 2 and Figure 3 indicate that the forward primer is 100% convergent with *Campylobacter*, and the reverse primer has a convergence of 95%. Due to the fact that the reverse primer is not fully convergent with *Campylobacter*, a systemic mismatch of the divergence site was analyzed. The results are shown in Figure 4.

The location of the mismatch in the 5' region of primer allowed the use of universal primers to obtain amplification products for sequencing.

Table 3. Conditions and modes of PCR reaction

When PCR fragments are generated for further sequencing:			
Composition of the reaction mixture:		PCR conditions	
Q5 PCR buffer × 2.0	12,5 µl	98	120
Water	7 µl	Denaturation	
Prmix	3 µl	54	30
DNA	2 µl	72	20
Eva-green stain	0,5 µl	98	15
30 cycles			
When performing real-time PCR:			
Composition of the reaction mixture:		PCR conditions	
PC × 2.5	10 µl	95	400
Water	15 µl	60	40
Prmix	3 µl	95	15
DNA	2 µl	40 cycles	
Eva-green stain	0,4 µl		
Taq-polymerase	0,4 µl		

As a result of sequencing carried out together with ZAO «Eurogen» of purified DNA fragments of *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* 70.2T strain, its nucleotide sequence was established and the species specificity of the strain under investigation was confirmed. This allowed to use the strain as a positive control in the development of gene-specific *Campylobacter* spp. PCR test system.

When selecting gene-specific primers in NCBI database, a more conservative 16S rDNA ITS sequence was selected, because the constitutive genes of *Campylobacter* (house-keeping genes) possess high species specificity. The results of the convergence study of the selected gene-specific forward and reverse primers to various species of *Campylobacter* genus bacteria are presented in Figure 5 and Figure 6.

From the data presented, it is clear that the selected gene-specific primers are 100% convergent with the genome of *Campylobacter* genus bacteria.

To calculate the sensitivity and efficiency of PCR reaction with the gene-specific primers, PCR was performed using a series of ten-fold dilutions of DNA. The results of the primer sensitivity are presented in Figure 7.

Based on the analysis of the data presented in Figure 7, the fifth DNA dilution was taken as the lower limit of detection for PCR method, equivalent to 1×10^4 bacterial cells in 1 cm³ of suspension.

The results obtained in real-time PCR correlate with the calculated data and confirm the 100% specificity of the selected primers for *Campylobacter* genus bacteria. The efficiency of PCR is not less than 95% (Figure 8).

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Campylobacter sputorum strain RM8705, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019685.1
Campylobacter sputorum by paraoreoviricus LMG 11764 strain LMG 17589, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019684.1
Campylobacter sputorum by faecalis CCLUG 20703, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019683.1
Campylobacter sputorum by sputorum RM3237, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019682.1
Campylobacter jejuni strain FORC_046, complete genome	30.2	112	100%	0.57	100%	CP017229.1
Campylobacter jejuni strain 11643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372576.1
Campylobacter jejuni strain 11657 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372575.1
Campylobacter jejuni strain 11024 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372574.1
Campylobacter jejuni strain 11044 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372573.1
Campylobacter jejuni strain 13775 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372572.1
Campylobacter jejuni subsp. jejuni strain FDAARGOS_265, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP022079.1
Campylobacter jejuni subsp. jejuni strain FDAARGOS_262, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP022076.1
Campylobacter jejuni subsp. jejuni strain ATCC 35924, complete genome	30.2	114	100%	0.57	100%	CP020045.1
Campylobacter jejuni strain NCTC12562, complete genome	30.2	114	100%	0.57	100%	CP019965.1
Campylobacter coli strain aerotolerant OR12, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP018977.1
Campylobacter pinnipediorum subsp. pinnipediorum strain RM17262, complete genome	30.2	111	100%	0.57	100%	CP012548.1

Figure 2. Estimation of the specificity of the forward primer for *Campylobacter* sequencing

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Campylobacter jejuni strain 11643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.001	100%	MF372576.1
Campylobacter jejuni strain 13775 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.001	100%	MF372572.1
Uncultured Campylobacter sp. clone 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.001	100%	KC535089.1
Uncultured Campylobacter sp. isolate DGGF gel band S9J4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.001	100%	EF531939.1
Campylobacter coli strain BG2108, complete genome	32.2	271	100%	0.36	95%	CP017878.1
Campylobacter coli strain ZV1224, complete genome	32.2	328	100%	0.36	95%	CP017875.1
Campylobacter coli strain WA333, complete genome	32.2	303	100%	0.36	95%	CP017873.1
Campylobacter coli strain BP3183, complete genome	32.2	319	100%	0.36	95%	CP017871.1
Campylobacter coli strain YF2105, complete genome	32.2	271	100%	0.36	95%	CP017865.1
Campylobacter jejuni strain Cj677C078, complete genome	32.2	344	100%	0.36	95%	CP010507.1
Campylobacter jejuni strain Cj677C0538, complete genome	32.2	344	100%	0.36	95%	CP010485.1
Campylobacter coli strain OR12, complete genome	32.2	372	100%	0.36	95%	CP013733.1
Campylobacter lari strain RM16712, complete genome	32.2	433	100%	0.36	95%	CP007778.1
Campylobacter lari strain RM16701, complete genome	32.2	297	100%	0.36	95%	CP007777.1
Campylobacter lari strain NCTC 11845, complete genome	32.2	459	100%	0.36	95%	CP007775.1
Campylobacter volucrii LMG 24379, complete genome	32.2	390	100%	0.36	95%	CP007774.1
Campylobacter subantarcticus LMG 24377, complete genome	32.2	483	100%	0.36	95%	CP007773.1
Campylobacter subantarcticus LMG 24374, complete genome	32.2	465	100%	0.36	95%	CP007772.1
Campylobacter lari subsp. concheus LMG 11760, complete genome	32.2	370	100%	0.36	95%	CP007771.1

Figure 3. Estimation of the specificity of the reverse primer for *Campylobacter* sequencing

Campylobacter coli strain BG2108, complete genome

Sequence ID: CP017878.1 Length: 1695638 Number of Matches: 11

Range	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1114526 to 1114545	32.2 bits(16)	0.36	19/20(95%)	0/20(0%)	Plus/Plus
Query	1		CGGCTCAATTCCTTGGAGTTT	20	
Sbjct	1114526		CGGCTCAATTCCTTGGAGTTT	1114545	

Figure 4. System mismatch of the universal reverse primer

To determine unique character of PCR reaction, a series of comparative experiments was performed using microorganisms that may be detected in samples along with

Campylobacter (Figure 9). The most common are the associates of campylobacteria microbiome with the bacteria of *Salmonella* and *Escherichia* genera. In this connection, it was interesting to conduct a PCR study with the selected gene-specific primers for *Salmonella* and *Escherichia*.

The analysis of the data obtained from PCR reaction (Figure 9) showed that the selected primers give a positive reaction to the bacteria of *Salmonella* and *Escherichia* genera. Therefore, the specificity of the reaction when using these primers was not confirmed.



Figure 5. Convergence of the gene-specific forward primer to the genome of *Campylobacter* genus bacteria



Figure 6. Convergence of the gene-specific reverse primer to the genome of *Campylobacter* genus bacteria

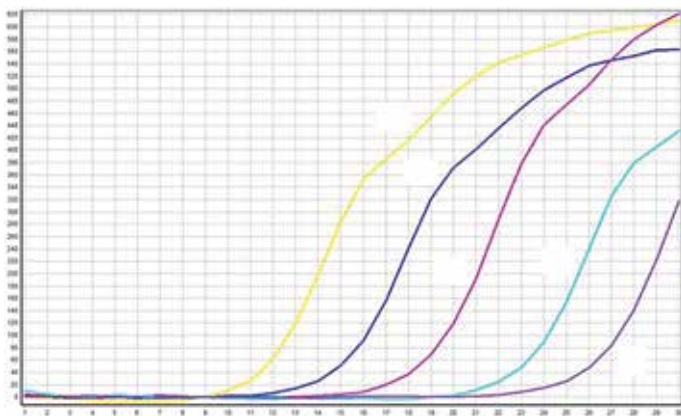


Figure 7. Sensitivity results of the gene-specific primers for *Campylobacter*

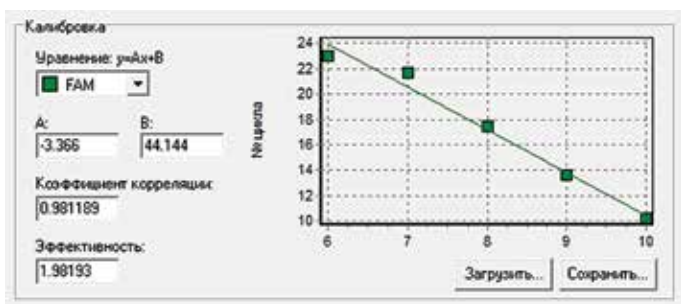


Figure 8. The curve of the calculated efficiency of PCR reaction

For the selection of specific primers, *Campylobacter* 16S DNA regions was aligned with homologous regions of 16S DNA from the bacteria of *Salmonella*, *Escherichia* and *Aeromonas* genera (Figure 10).

As a result of the alignment, it was found that the reverse primer has only two mismatches for homologous regions of bacterial DNA located in the 5' region of the primer. This sequence does not have proper specificity, so when it is used, the test system will give a false positive reaction.

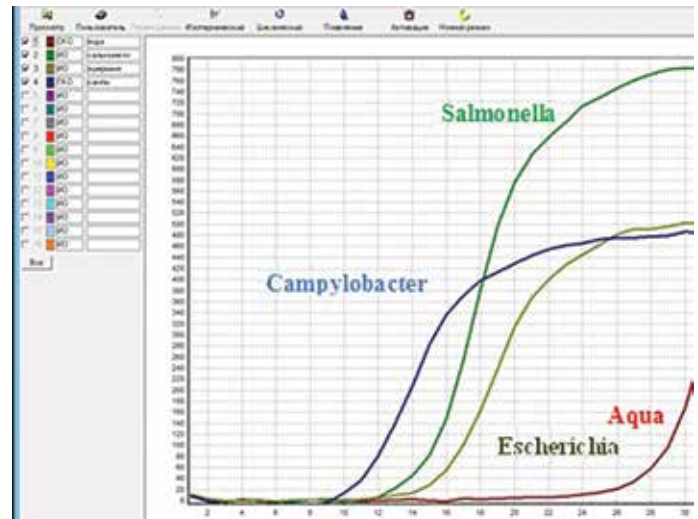


Figure 9. Results of PCR study using the universal gene-specific primers

To avoid false positive reactions, it was decided to move the complementary primer-binding region of the 3' region by 16 base pairs of nucleotides from the position 1338 to the position 1322 (Figure 11).

From the data presented, it is clear that the new reverse primer has 3 mismatches for homologous DNA regions of *Salmonella*, *Escherichia* and *Aeromonas* bacteria located in the 3' primer region responsible for the specific annealing.

To confirm the specificity of PCR reaction with the new selected primers, after homologous DNA regions were aligned, PCR reaction was performed with the bacteria of *Salmonella*, *Escherichia* and *Campylobacter* genera (Figure 12).

It is noted that the new selected primers are specific for the bacteria of *Salmonella* and *Escherichia* genera. The obtained results of the amplification allow to state that the use of the new selected primers excludes a diagnostic

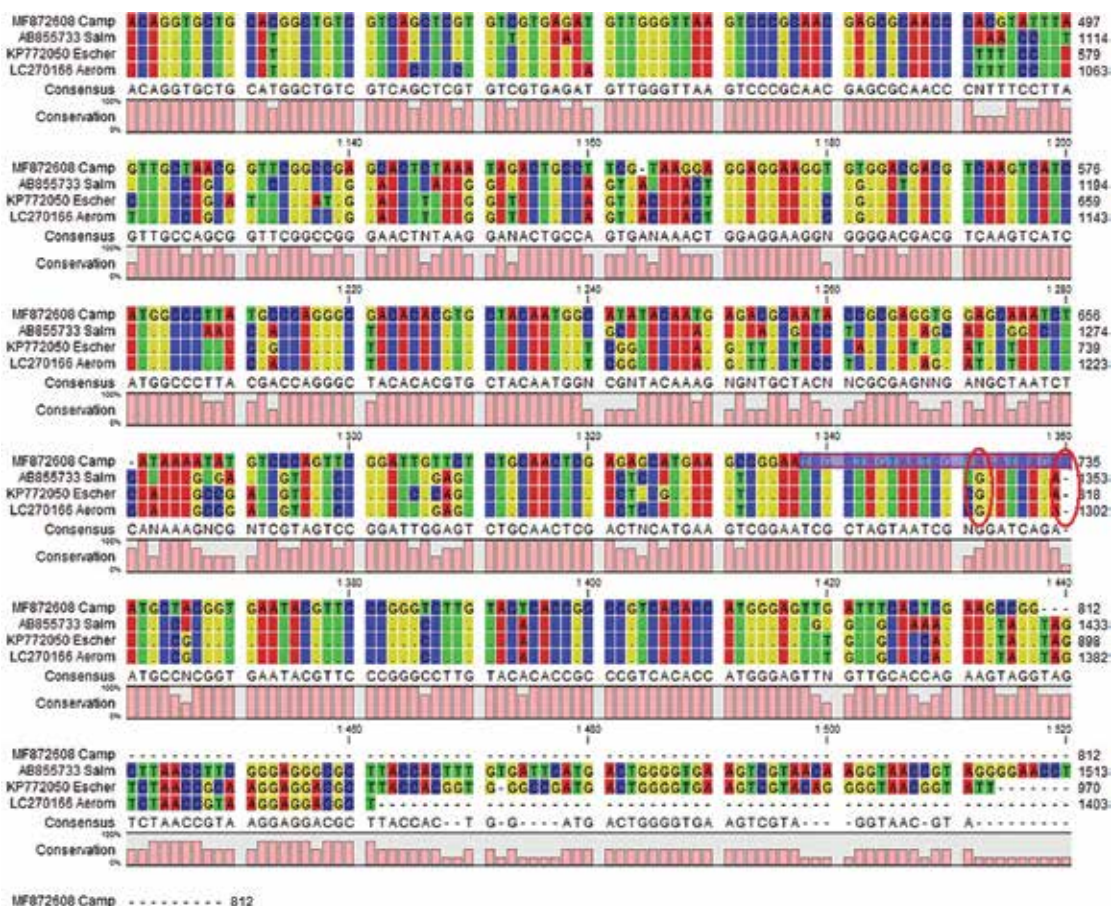


Figure 10. Alignment of homologous DNA regions from the bacteria of *Salmonella*, *Escherichia*, *Aeromonas* and *Campylobacter* genera containing the universal reverse primer annealing site

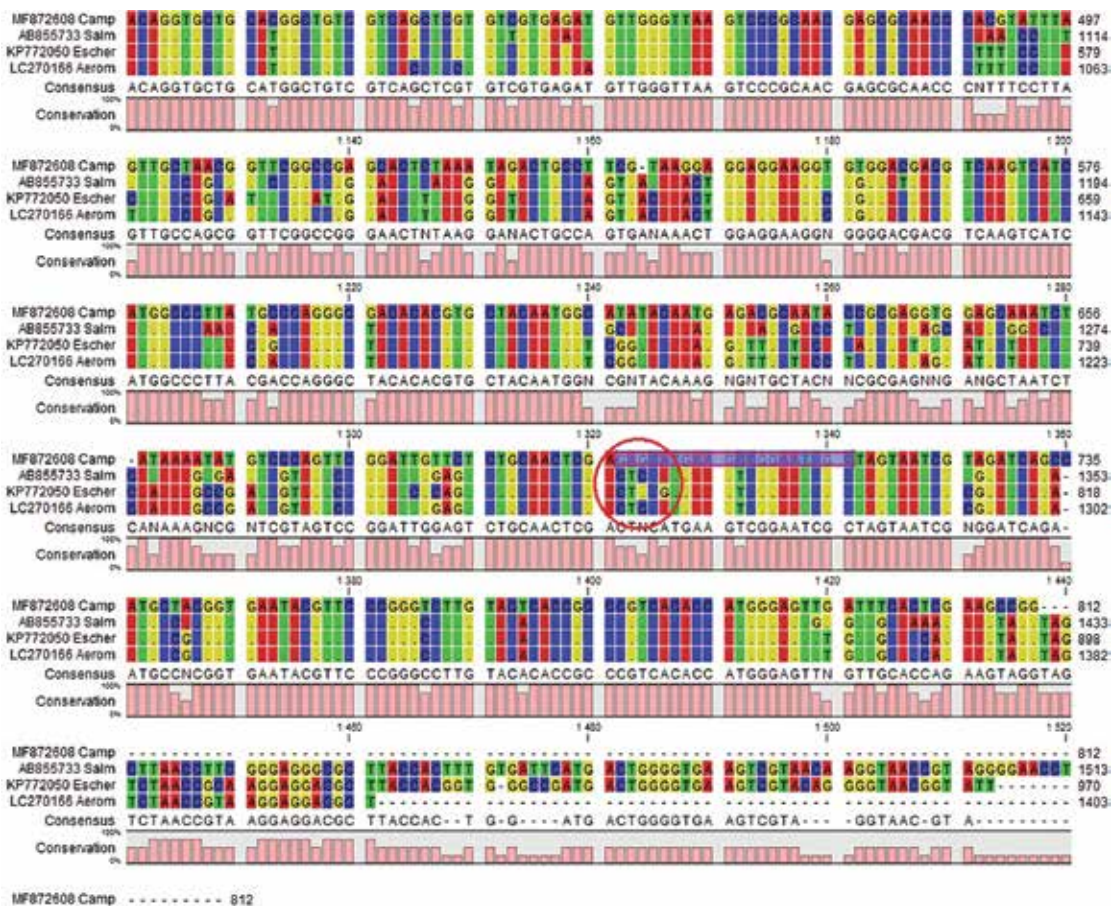


Figure 11. Alignment of homologous DNA regions from the bacteria of *Salmonella*, *Escherichia*, *Aeromonas* and *Campylobacter* genera containing the reverse primer annealing site

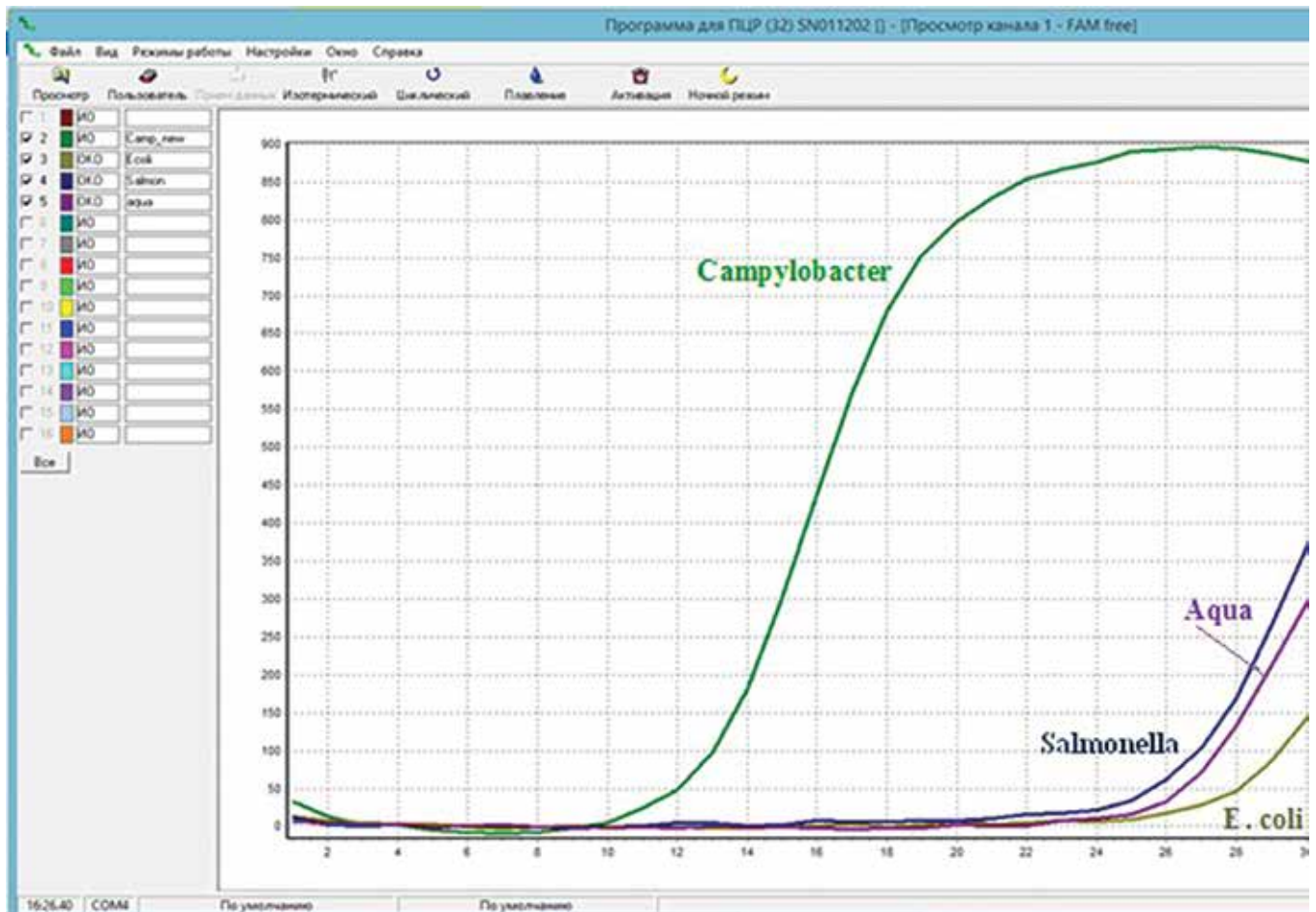


Figure 12. Amplification results for *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* and *Escherichia coli*

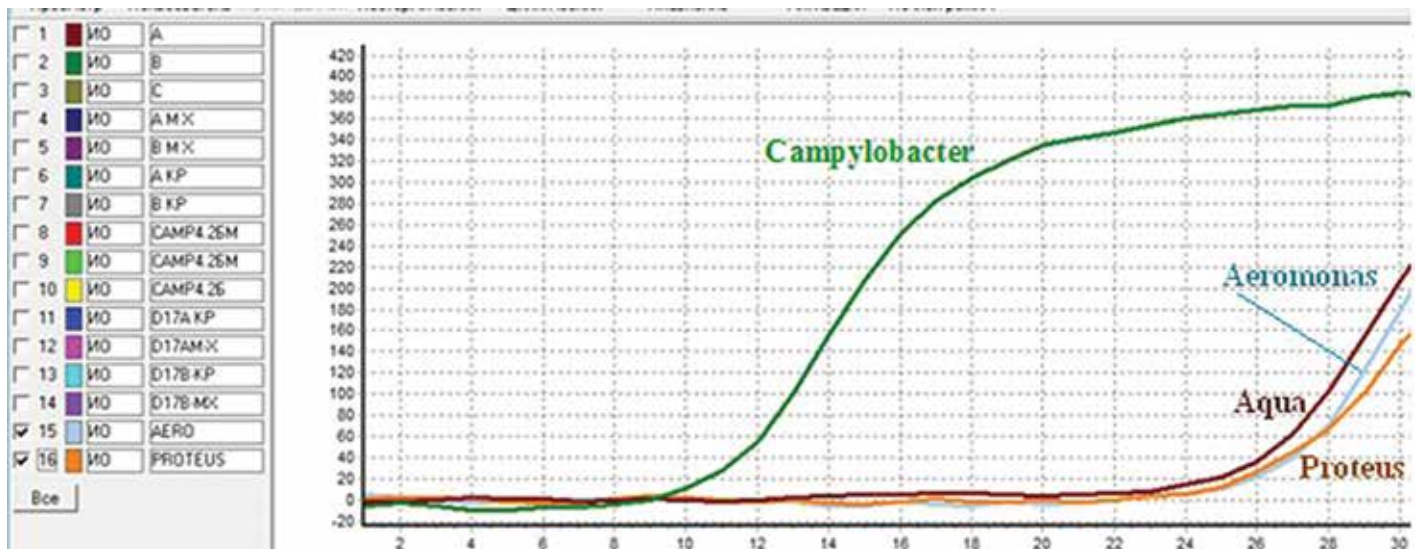


Figure 13. Amplification results for *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas salmonicida* and *Proteus mirabilis*

error in the differentiation of *Campylobacter* genus from the bacteria of *Salmonella* and *Escherichia* genera.

Taking into account that *Campylobacter* may occur in a mixed culture with *Proteus* and *Aeromonas* genera, a comparative intergeneric diagnosis was carried out by performing PCR with the selected primers (Figure 13).

The data presented in the figure prove that the selected primers have high specificity for the bacteria of *Aeromonas* and *Proteus* genera.

To evaluate the diagnostic capabilities of the developed PCR test system, a series of comparative test with a traditional microbiological method for *Campylobacter* genus bacteria detection were carried out.

As it is seen from the PCR study data presented in Figure 14, only sample «B» gave a positive amplification reaction, which indicates the presence of *Campylobacter* genus bacteria. Samples «A» and «C» gave a negative reaction during PCR, which confirms the absence of *Campylobacter* spp.

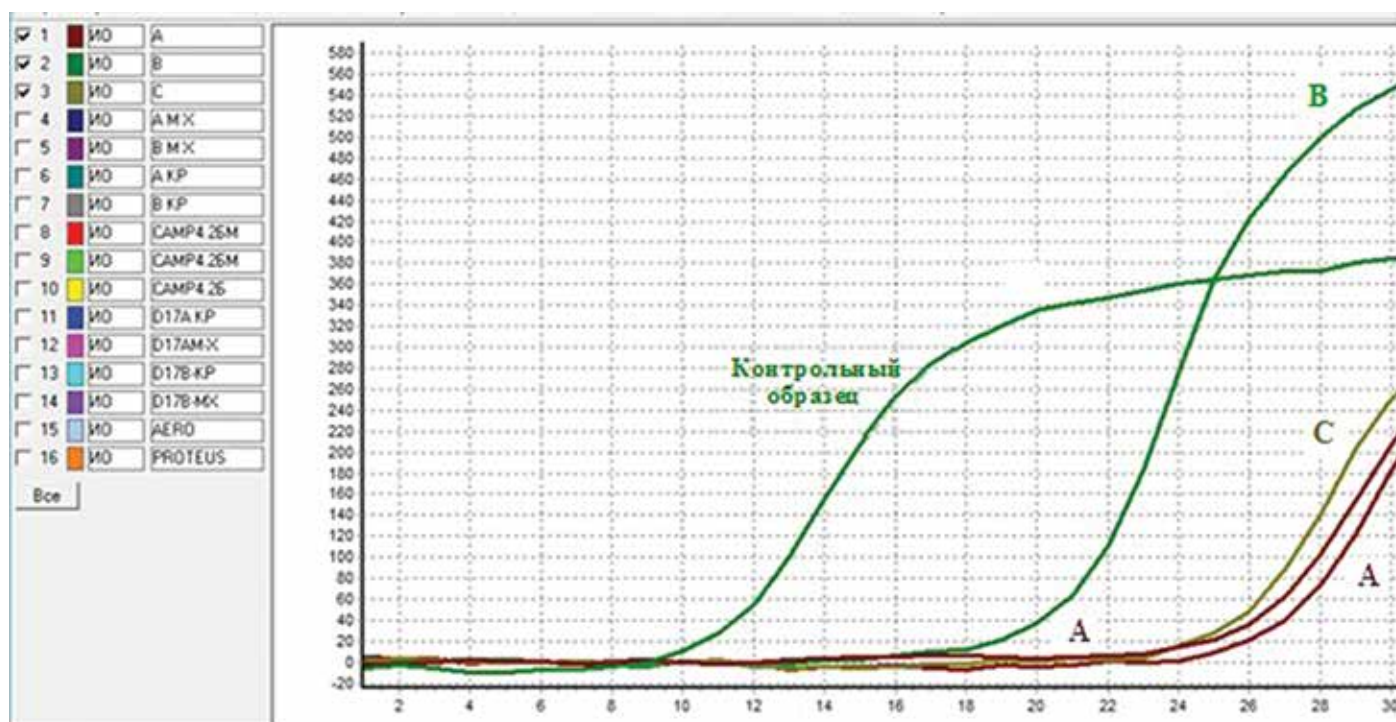


Figure 14. Amplification curves for *Campylobacter jejuni* (positive control) and coded samples «A», «B», and «C»

In parallel with PCR analysis, samples «A», «B», and «C» were analyzed by the cultural method. As a result of incubation of these samples and subsequent biochemical identification, bacteria of *Campylobacter* genus were detected only in sample «B».

The results obtained during the comparative tests by different methods showed the complete convergence of the cultural method and PCR, which makes it possible to use the developed PCR test system in laboratory practice.

Conclusions

As a result of the conducted studies, approaches to the selection of target genes within the *Campylobacter* genus were developed. The characteristics of primers for the determination of campylobacteria were studied, which resulted in the selection of gene-specific primers to bacteria of *Campylobacter* genus, on the basis of which a ready-to-use PCR test system for the detection of *Campylobacter* spp. was developed. An assessment of PCR specificity, accuracy and effectiveness was made. The developed test-system was verified in a cycle of FEPAS international comparative tests. It is established that this test system may be used for the rapid detection of *Campylobacter* genus bacteria in meat of slaughter animals. The results obtained are confirmed by microbiological reference method.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Campbell, B.J., Engel, A.S., Porter, M.L., Takai, K. (2006). The versatile ϵ -proteobacteria: Key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology*, 4(6), 458–468.
- ВОЗ публикует список бактерий, для борьбы с которыми срочно требуется создание новых антибиотиков. Центр СМИ ВОЗ. [Интернет ресурс: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/ru/> Дата обращения 29.10.2017].
- The global view of *Campylobacteriosis*. Report of an expert consultation, (2012). Utrecht, Netherlands 9–11 July. — 136 p.
- Altekruse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I., Swerdlow, D.L. (1999). *Campylobacter jejuni* — an emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Disease*, 5(1), 28–35.
- Кампилобактериоз. Информационный бюллетень ВОЗ. [Интернет ресурс: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/ru/>. Дата обращения 29.10.2017].
- Microbiological Risk Assessment Series. *Salmonella and Campylobacter in chicken meat*. (2009). Meeting report FAO and WHO.
- Codex Alimentarius CAC/GL 78–2011, (2011) Guidelines for the Control of *Campylobacter* and *Salmonella* in Chicken Meat.
- 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. (2016). Изучение характера контаминации и уровней содержания бактерий рода *Campylobacter* в отдельных видах пищевой продукции. *Вопросы питания*, 85(5), 52–59.
- Little, C.L., Richardson, J.F., Owen, R.J., de Pinna, E., Threlfall, E.J. (2008). *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003–2005. *Food microbiology*, 25(3), 538–543.
- Бессарабов Б.Ф., Вашутин А.А., Воронин Е.С. и др. Под ред. А. А. Сидорчука (2007). *Инфекционные болезни животных*. М., КолосС.—671 с. ISBN 978–5–9532–0301–2
- Dikeman, M., Devine, C. (2014). *Encyclopedia of Meat Sciences*. Second Edition. Cambridge, Academic Press. — 1525 p. ISBN: 978–012384731–7; 978–012384734–8
- Bojanić, K., Midwinter, A.C. Marshall, J.C., Rogers, L.E., Biggs, P.J., Acke, E. (2017) Isolation of *campylobacter* spp. from client-owned dogs and cats, and retail raw meat pet food in the Manawatu, New Zealand. *Zoonoses Public Health*, 64(6). 438–449.

13. Groff, A.C.M., Kirinus, J.K., Sá e Silva, M., Machado, G., Costa, M.M., Vargas, A.P.C. (2010). Polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(12), 1031–1035.
14. Chaban, B., Chu, S., Hendrick, S., Waldner, C., Hill, J.E. (2012). Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-

time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 76(3), 166–173.

15. Он-лайн библиотека стандартов ISO [Интернет ресурс: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10272:-1:ed-2:v1:en> Дата обращения 20.10.017].

REFERENCES

- Campbell, B.J., Engel, A.S., Porter, M.L., Takai, K. (2006). The versatile ϵ -proteobacteria: Key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology*, 4(6), 458–468.
- WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Media center of WHO. [Electronic resource: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/ru/> Access date 29.10.2017].
- The global view of Campylobacteriosis. Report of an expert consultation, (2012). Utrecht, Netherlands 9–11 July.—136 p.
- Altekruse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I., Swerdlow, D.L. (1999). *Campylobacter jejuni* — an emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Disease*, 5(1), 28–35.
- Campylobacter. Fact sheet. WHO. [Electronic resource: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/ru/>. Access date 29.10.2017].
- Microbiological Risk Assessment Series. Salmonella and Campylobacter in chicken meat. (2009). Meeting report FAO and WHO.
- Codex Alimentarius CAC/GL 78–2011, (2011) Guidelines for the Control of Campylobacter and Salmonella in Chicken Meat.
- Efimochkina, N.R., Bykova, I.B., Stetsenko V.V., Minaeva L.P., Pichugina T.V., Markova Yu.M., Korotkevich Yu.V., Kozak S.S., Sheveleva S.A. (2016). Study of the nature of contamination and levels of bacteria of the genus *Campylobacter* in certain types of food products. *Voprosy pitaniya*, 85(5), 52–59. (in Russian).
- Little, C.L., Richardson, J.F., Owen, R.J., de Pinna, E., Threlfall, E.J. (2008). Campylobacter and Salmonella in raw red meats in the United Kingdom: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003–2005. *Food microbiology*, 25(3), 538–543.
- Bessarabov B.F., Vashutin A.A., Voronin Ye.S. and other. Infectious diseases of animals. Moscow.: Kolos.—671 p. (in Russian).
- Dikeman, M., Devine, C. (2014). Encyclopedia of Meat Sciences. Second Edition. Cambridge: Academic Press. — 1525 p. ISBN: 978-012384731-7; 978-012384734-8
- Bojanić, K., Midwinter, A.C. Marshall, J.C., Rogers, L.E., Biggs, P.J., Acke, E. (2017) Isolation of campylobacter spp. from client-owned dogs and cats, and retail raw meat pet food in the Manawatu, New Zealand. *Zoonoses Public Health*, 64(6). 438–449.
- Groff, A.C.M., Kirinus, J.K., Sá e Silva, M., Machado, G., Costa, M.M., Vargas, A.P.C. (2010). Polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(12), 1031–1035
- Chaban, B., Chu, S., Hendrick, S., Waldner, C., Hill, J.E. (2012). Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 76(3), 166–173.
- Online Browsing Platform ISO [Electronic resource: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10272:-1:ed-2:v1:en> Access date 20.10.017].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Батаева Дагмара Султановна — кандидат технических наук, доцент, руководитель направления микробиологии, ведущий научный сотрудник лаборатории «Гигиена производства и микробиология», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26
Тел.: +7-495-676-60-11
E-mail: d.bataeva@fncps.ru
*автор для контактов

Минаев Михаил Юрьевич — кандидат технических наук, руководитель ПЦР направления, ведущий научный сотрудник в лаборатории «Гигиена производства и микробиология», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316 г. Москва, ул. Талалихина 26,
Тел.: +7-495-676-60-11
E-mail: m.minaev@fncps.ru

Юшина Юлия Константиновна — кандидат технических наук, руководитель лаборатории «Гигиена производства и микробиология», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
10931, г. Москва, ул. Талалихина, 26
Тел. +7-495-676-91-26
E-mail: yu.yushina@fncps.ru

Соколова Ольга Вячеславовна — кандидат технических наук, младший научный сотрудник лаборатории «Гигиена производства и микробиология», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316 г. Москва, ул. Талалихина 26,
Тел.: +7-495-676-60-11
E-mail: o.sokolova@fncps.ru

Зайко Елена Викторовна — старший лаборант лаборатории «Гигиена производства и микробиологии», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316 г. Москва, ул. Талалихина 26,
Тел.: +7-495-676-60-11
E-mail: e.zaiko@fncps.ru

Критерии авторства

Ответственность за работу и предоставленные сведения несут все авторы.
Все авторы в равной степени участвовали в этой работе.
Батаева Д.С. разрабатывала научно-методические подходы к проведению работ, определяла объем исследований, анализировала полученные данные, выполняла описательную часть и корректировала после подачи в редакцию
Минаев М.Ю. проводил подбор праймеров для постановки ПЦР, анализировал полученные данные
Юшина Ю.К. анализировала полученные данные, проводила описательную часть работы
Соколова О.В. проводила обзор и анализ литературы, выполняла описательную часть
Зайко Е.В. отбирала объекты исследования, выполняла микробиологический и ПЦР анализ.
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.11.2017

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Dagmara S. Bataeva — candidate of technical sciences, docent, Head of the Direction of Microbiology, leading scientific worker of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology» V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-60-11
E-mail: d.bataeva@fncps.ru
*corresponding author

Mikhail Yu. Minaev— candidate of technical sciences, a head of the Molecular diagnostic division, leading scientific worker of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology» V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-60-11
E-mail: m.minaev@fncps.ru

Yulia K. Yushina — candidate of technical sciences, docent, Head of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology», V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Talalikhina str. 26,
Tel.: +7-495-676-91-26
E-mail: yu.yushina@fncps.ru

Olga V. Sokolova — candidate of technical sciences, junior researcher worker of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology» V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-60-11
E-mail: o.sokolova@fncps.ru

Elena V. Zaiko — senior research technician of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology» V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-60-11
E-mail: e.zaiko@fncps.ru

Contribution

All authors bear responsibility for the work and presented data.
All authors made an equal contribution to the work.
Dagmara S. Bataeva developed scientific and methodological approaches to work, determined the scope of research, analyzed the data obtained, performed the narrative and corrected it after submitting to the editorial office.
Mikhail Yu. Minaev conducted the selection of primers for the production of PCR, analyzed the data obtained
Yulia K. Yushina analyzed the obtained data, conducted descriptive part of the work
Olga V. Sokolova conducted a review and analysis of the literature, carried out the descriptive part
Elena V. Zaiko selected research objects, carried out microbiological and PCR analysis.
The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 15.11.2017