

# Kampilobakterijų paplitimas importuotuose broilerių sparneliuose ir blauzdelėse, parduodamuose Lietuvoje

Dominyka Baltutytė,

Laura Babonytė,

Sigita Ramonaitė

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas,  
Veterinarijos akademija,  
Tilžės g. 18,  
47181 Kaunas, Lietuva  
El. paštas dominyka.baltutyte@stud.lsmu.lt

Darbo tikslas – įvertinti kampilobakterijų paplitimą importuotose broilerių blauzdelėse ir sparneliuose.

Vienų metų tyrimo laikotarpiu buvo ištirti 138 importuoti broilerių mėginiai (68 vnt. atvėsintų sparnelių ir 70 vnt. blauzdelių) iš trijų skirtingų pardavimo vietų. Kampilobakterijų aptikimas ir išskyrimas atliktas klasikiniais mikrobiologijos metodais, o identifikavimas – taikant dauginį polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodą. Gauti PGR produktai buvo analizuojami agarozės gelyje taikant elektroforezę. Po epidemiologinio tyrimo buvo atrinktos *Campylobacter jejuni* ir *Campylobacter coli* padermės, įvertintas virulentiškumo genų paplitimas.

Atlikus tyrimą nustatyta, kad kampilobakterijos buvo aptiktos 36 mėginiuose (26,1 %): 19 vnt. atvėsintų sparnelių (27,9 %) ir 17 vnt. atvėsintų blauzdelių (24,3 %). Dažniau kampilobakterijos atvėsintuose broilerių mėginiuose buvo aptiktos rudens (rugsėjo–lapkričio mėn.) (47,2 %) ir žiemos (gruodžio–vasario mėn.) (41,6 %) laikotarpiais, palyginti su pavasario (kovo–gegužės mėn.) (5,5 %) ir vasaros (birželio–rugpjūčio mėn.) (5,5 %). Pardavimo vieta produktų užkrėstumui kampilobakterijomis reikšmingos įtakos neturėjo ( $p > 0,05$ ).

Išanalizavus virulentiškumo veiksnius nustatyta, kad *C. jejuni* ir *C. coli* padermėse iš tirtų trijų virulentiškumo genų aptikti du *CadF* ir *CdtA*. *CdtA* genas rastas beveik visose tirtose kampilobakterijų padermėse, išskirtose iš importuotų broilerių mėginių (94,4 %).

**Raktažodžiai:** kampilobakterijos, importuoti broilerių produktai, paplitimas, virulentiškumas, užkrėstumas

## ĮVADAS

Nuo 2005 m. Europos Sąjungoje (ES) kampilobakteriozė įvardijama kaip dažniausia žmonių virškinamojo trakto liga. Naujausiais duomenimis, 2018 m. ES patvirtintų kampilobakteriozės atvejų skaičius buvo 246 571, o tai atitinka 64,1 patvirtintų atvejų 100 000 gyventojų (EFSA, ECDC, 2019). Priklausomai nuo *Campylobacter* spp. padermių virulentiškumo ir paciento jautrumo, ligos sunkumas gali labai skirtis. Pagrindiniai simptomai yra viduriavimas, pilvo skausmai ir karščiavimas. Sunkesniais ligos atvejais gali pasireikšti vėmimas ir viduriavimas su krauju (Meunier et al., 2016).

Dažniausiai pasaulyje kampilobakteriozė sukelia *C. jejuni* (90 % susirgimo atvejų) ir *C. coli* (mažiau nei 10 % susirgimo atvejų). Lietuvoje, kaip ir kitose pasaulio šalyse, yra aktuali kampilobakterijų sukeliamą zoonozę. 2018 m. buvo patvirtinta 919 atvejų, tai sudarė 32,7 atvejo 100 000 gyventojų (EFSA, ECDC, 2019). 2020 m. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centro (ULAC) ataskaitoje paskelbta, kad per 2019 m. užregistruoti net 1 225 kampilobakteriozės atvejai, tai sudarė 43,8 atvejo 100 000 gyventojų (Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras, 2019).

Naminiai paukščiai yra natūralus *Campylobacter* rezervuaras. Vienas iš svarbiausių žmonių kampilobakteriozės šaltinių yra viščių broilerių

mėsa. Blogai termiškai apdorotų broilerių produktų vartojimas arba kryžminė tarša nuo žalių broilerių produktų yra pagrindiniai rizikos veiksniai, susiję su žmonių kampilobakterioze. Broilerių pulkų užkrėstumas kampilobakterijomis dažnai lemia jų paplitimą visoje broilerių mėsos gamybos grandinėje ir užkrėstų produktų patekimą į mažmeninę prekybą (Skarp et al., 2016). Lietuvoje atlikto tyrimo rezultatai atskleidė, kad 80,95 % broilerių pulkų užkrėsti kampilobakterijomis (Kudirkiene et al., 2010). Didelis broilerių pulkų užkrėstumas galėjo lemti ir broilerių produktų parduodamų mažmeninėje prekyboje užkrėstumą kampilobakterijomis, kuris siekė 46,55 % (Bunevičienė et al., 2010). Kampilobakterijų paplitimas broilerių mėsoje 2017 m. ES šalyse buvo 37,4 % (EFSA and ECDC, 2018). Kampilobakterioze užsikrėsti gali pakakti nedidelio kiekio kampilobakterijų – nuo 500 iki 800 ksv/g (Nielsen et al., 2012).

Lietuvoje yra atliktų mokslinių tyrimų, kuriuose įvertintas broilerių pulkų ir jų produktų, parduodamų mažmeninėje prekyboje, užkrėstumas kampilobakterijomis (Bunevičienė et al., 2010; Kudirkiene et al., 2010). Tačiau tyrimų apie šių bakterijų paplitimą importuotose ir parduodamose Lietuvoje broilerių blauzdelėse ir sparneliuose iki šiol nebuvo. Lietuvos statistikos departamento duomenimis, 2018 m. sausio–kovo mėn. paukštienos ir jos subproduktų importas Lietuvoje sudarė 10 049 t. Didžiąją dalį importuotos produkcijos sudarė paukštiena iš Lenkijos – 6 966 t, Latvijos – 1 287 t, Jungtinės Karalystės – 399 t ir Olandijos – 336 t (Kairytė, 2018). Šio darbo tikslas buvo įvertinti kampilobakterijų paplitimą importuotose ir parduodamose Lietuvoje broilerių blauzdelėse bei sparneliuose. Tyrimo metu buvo siekiama nustatyti ne tik broilerių produktų užkrėstumą kampilobakterijomis skirtingose mažmeninės prekybos vietose, bet ir jų rūšinę įvairovę bei *CeuE*, *CadF* ir *cdtA* virulentiškumo genų paplitimą *C. jejuni* ir *C. coli* padermėse.

## METODAI IR SĄLYGOS

Siekiant epidemiologiškai įvertinti kampilobakterijų paplitimą importuotuose broilerių produktuose (atvėsintuose sparneliuose ir blauzdelėse) tyrimas buvo atliekamas metus laiko (2018 m. spalio – 2019 m. lapkritis). Iš trijų skirtingų pre-

kybos vietų (turgaus, firminės vištienos parduotuvės ir vieno iš didžiųjų prekybos centrų) kas antrą savaitę buvo įsigyjama po vieną importuotą broilerių atvėsintą sparnelį ir blauzdelę. Kiekvienas produktas prekybos vietoje buvo pasveriamas ir atskirai įdedamas į vienkartinius maišelius. Broilerių produktai iš prekybos vietų šaltkrepyje iš karto buvo pristatomi į laboratoriją ir tą pačią dieną atliekami tyrimai. Per visą tyrimų laikotarpį du kartus firminėje parduotuvėje nebuvo galima įsigyti broilerių produktų ir du kartus prekybos centre nebuvo atvėsintų sparnelių, todėl tyrimų laikotarpiu iš viso ištirti 138 broilerių produktai. Kampilobakterijoms aptikti ir identifikuoti buvo taikomi klasikiniai mikrobiologiniai bei molekuliniai tyrimo metodai. Po epidemiologinio tyrimo buvo atrinktos *C. jejuni* ir *C. coli* padermės ir įvertintas trijų virulentiškumo genų (*CeuE*, *CadF*, *cdtA*) paplitimas.

**Kampilobakterijų išskyrimas.** Kampilobakterijoms išskirti buvo taikomi tiesioginiai ir pagausinimo metodai. Ruošiant mėginius kiekvienas broilerių produktas buvo įdėtas į homogenizavimo maišelį su 100 ml buferinio peptono vandens, rankiniu būdu maišomas ir masažuojamas. Buvo atliekami du dešimties kartų praskiedimai.

Taikant tiesioginį metodą, į sterilias Petri lėkšteles su selektyvia mCCDA terpe pasėta 0,1 ml mėginio iš atitinkamų praskiedimų ir lėkštelės, inkubuotos 37 °C temperatūroje 48 val. termostate mikroaerofilinėmis sąlygomis. Atliekant kampilobakterijų aptikimą naudojant pagausinimo metodą, mėginiai po 1 ml buvo sėjami į mėgintuvėlį su 9 ml Boltono pagausinimo sultiniu, inkubuoti mikroaerofilinėmis sąlygomis 42 °C temperatūroje 24 val. Po inkubavimo 10 µl mėginio persėta į mCCDA terpę ir inkubuota 37 °C temperatūroje 48 val. mikroaerofilinėmis sąlygomis.

Po inkubavimo iš lėkštelių buvo atrenkamos bakterijų kolonijos, kurios pagal morfologinius požymius būdingos kampilobakterijoms. Jos persėtos į lėkšteles su kraujo agaru ir inkubuotos 37 °C temperatūroje 48 val. termostate mikroaerofilinėmis sąlygomis. Po inkubavimo grynos bakterijų kultūros buvo surinktos nuo lėkštelių ir užšaldytos mėgintuvėliuose su smegenų ir širdies sultiniu (BHI), papildytu 30 % glicerolio, taip paruoštos bakterijų kultūros buvo laikomos –80 °C temperatūroje iki tolimesnių tyrimų.

**DNR išskyrimas.** Nuo lėkštelių su kraujo agaru buvo surenkamos užaugintos kampilobakterijų kultūros ir perkeltos į 1,5 ml mėgintuvėlį su 0,2 ml *PrepMan* tirpalu. Turinys sumaišytas ir perkeltas į 99 °C temperatūros termociklerį. Po 10 min. mėgintuvėliai buvo centrifuguoti 16 000 aps./min. greičiu 3 min. Viršutinė mėgintuvėlio skysčio dalis buvo perkelta į naujus 1,5 ml mėgintuvėlius ir vėl centrifuguota. Po 3 min. viršutinė skysčio dalis buvo supilta į naujus 0,2 ml mėgintuvėlius ir išskirta DNR užšaldyta –20 °C temperatūroje iki PGR tyrimo.

**Kampilobakterijų identifikavimas naudojant dauginį PGR metodą.** Kampilobakterijų identifikavimas buvo atliktas naudojant modifikuotą dauginį PGR metodą (Wang et al., 2002). PGR mišinys buvo ruošiamas 1,5 ml steriliame mėgintuvėlyje: 24 µl mišinio sudarė 12,5 µl *DreamTaq Green PCR Master Mix*, 10,5 µl sterilus bidistiliuotas vanduo ir 1 µl pradmenų mišinys, sudarytas iš 23SRNRF ir 23SRNRR pradmenų, patvirtinančių *Campylobacter* gentį, CJF ir CJR pradmenų, nustatančių *C. jejuni* rūšį, bei CCF ir CCR pradmenų, nustatančių *C. coli* rūšį (1 lentelė). Paruoštas mišinys buvo supilstomas į PGR mėgintuvėlius po 24 µl ir pridėta 1 µl atšildytos, iš kampilobakterijų išskirtos, DNR. Mėgintuvėlio turinys maišytas 15–30 s sukurinio tipo maišykle ir centrifuguotas 1 min. 4 000 aps./min. greičiu. Po to mėgintuvėliai sudėti į termociklerį ir pasirinkta atitinkama programa, kurios sąlygos: 95 °C temperatūroje laikoma 6 min. DNR polimerazei suaktyvinti, 95 °C – 0,5 min., denatūracijai įvykdyti, 53 °C – 0,5 min., specifinė temperatūra 23SRNRF, 23SRNRR, CJF, CJR, CCF ir CCR pradmenų mišinio prilydymui, 72 °C – 0,5 min. elongacijai įvykdyti ir 72 °C – 7 min. galutinei elongacijai įvykti. Denatūracijos, pradmenų miši-

nio prilydymo ir elongacijos žingsniai buvo kartojami 30 kartų.

**PGR produktų elektroforezė.** Iš 2,2 g agarozės, 110 ml TAE buferio ir 6,5 µl Etidžio bromido tirpalo buvo paruoštas agarozės gelis, kuriame aptinkami PGR produktai. Gelis buvo patalpintas į buferio vonelę ir 11 µl PGR produkto perkelta į jame esančius šulinėlius. Šulinėlių eilės centre buvo įdėta 3 µl markerio 100–1 000 bp (*GeneRuler* 100 bp DNA Ladder) susidariusiems produktams identifikuoti. Atlikus elektroforezę (50 min., 105 V), pagal nuotraukas, darytas UV šviesoje, buvo analizuoti susidarę PGR produktų ilgiai (1 lentelė). Kampilobakterijų PGR fragmentų ilgiai: *Campylobacter* spp. – 650 bp, *C. jejuni* – 323 bp, *C. coli* – 126 bp.

**Virulentiškumo genų identifikavimas naudojant PGR metodą.** Kampilobakterijų virulentiškumo genai (2 lentelė) buvo identifikuoti naudojant PGR metodą. PGR mišinys buvo ruošiamas 1,5 ml steriliame mėgintuvėlyje: 24 µl mišinio sudarė 7,25 µl *DreamTaq Green PCR Master Mix*, 15,75 µl sterilus bidistiliuotas vanduo ir 1 µl pradmenų pora (2 lentelė). Paruoštas mišinys buvo supilstomas į PGR mėgintuvėlius po 24 µl ir pridėta 1 µl atšildytos, iš kampilobakterijų išskirtos, DNR. Mėgintuvėlio turinys maišytas 15–30 s sukurinio tipo maišykle ir centrifuguotas 1 min. 4 000 aps./min. greičiu. Po to mėgintuvėliai sudėti į termociklerį ir nustatyta atitinkama programa pagal pasirinktą tyrimui geną. Termociklerio sąlygos *CadF* geno amplifikacijai: 94 °C temperatūroje laikoma 5 min. DNR polimerazei suaktyvinti, 95 °C – 1 min. denatūracijai įvykdyti, 45 °C – 1 min. specifinė temperatūra *CadF* geno pradmenų prilydymui, 71 °C – 1 min. elongacijai ir 72 °C – 5 min. galutinei elongacijai įvykti.

1 lentelė. Pradmenų poros

Table 1. Primer pairs

Kampilobakterijų rūšis <i>Campylobacter species</i>	Pradmenys <i>Primers</i>	DNR seka <i>DNR sequence</i>	PGR produkto ilgis <i>Length of PCR product</i>
<i>C. jejuni</i>	CJF	F – ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	323 bp
	CJR	R – GCCACAACAAGTAAAGAAGC	
<i>C. coli</i>	CCF	F – GTAAAACCAAAGCTTATCGTG	126 bp
	CCR	R – TCCAGCAATGTGTGCAATG	
<i>Campylobacter</i> spp.	23SF	F – TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG	650 bp
	23SR	R – ATCAATTAACCTTCGAGCACCG	

Denatūracijos, pradmenų prilydymo ir elongacijos žingsniai buvo kartojami 30 kartų (Wysok, Wojtacka, 2018). Termociklerio sąlygos *CdtA* geno amplifikacijai: 94 °C temperatūroje laikoma 1 min. DNR polimerazei suaktyvinti, 94 °C – 1 min. denatūracijai įvykdyti, 42 °C – 2 min. specifinė temperatūra *CdtA* geno pradmenų prilydymui, 72 °C – 3 min. elongacijai ir 72 °C – 5 min. galutinei elongacijai įvykti. Denatūracijos, pradmenų prilydymo ir elongacijos žingsniai buvo kartojami 30 kartų (Bang et al., 2003). Termociklerio sąlygos *CeuE* geno amplifikacijai: 95 °C temperatūroje laikoma 3 min. DNR polimerazei suaktyvinti, 95 °C – 0,5 min. denatūracijai įvykdyti, 57 °C – 0,5 min. specifinė temperatūra *CeuE* geno pradmenų prilydymui, 72 °C – 1 min. elongacijai ir 72 °C – 5 min. galutinei elongacijai įvykti. Denatūracijos, pradmenų prilydymo ir elongacijos žingsniai buvo kartojami 30 kartų (González-Domínguez et al., 1997). Vėliau agarozės gelyje elektroforezės metodu buvo analizuojami virulentiškumo genai.

**Statistinė analizė.** Tyrimų duomenys buvo įvertinti naudojant SPSS statistinį paketą (versija 25.0 SPSS Ibm.) ir 2019 m. „Microsoft Office Excel“ programą. Duomenims sisteminti naudoti aprašomosios statistikos metodai (procentinis pasiskirstymas, grafinis duomenų vaizdavimas), o kokybiniam rodiklių patikimumui nustatyti – taikomas Chi kvadrato kriterijus ( $X^2$ ). Duomenys statistiškai patikimi, kai  $p \leq 0,05$ .

## TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Per vienų metų tiriamąjį laikotarpį iš trijų skirtingų pardavimo vietų buvo surinkti ir ištirti 138 atvėsinti broilerių produktų mėginiai – iš jų 68 vnt.

atvėsintų sparnelių (49,3 %) ir 70 vnt. atvėsintų blauzdelių (50,7 %).

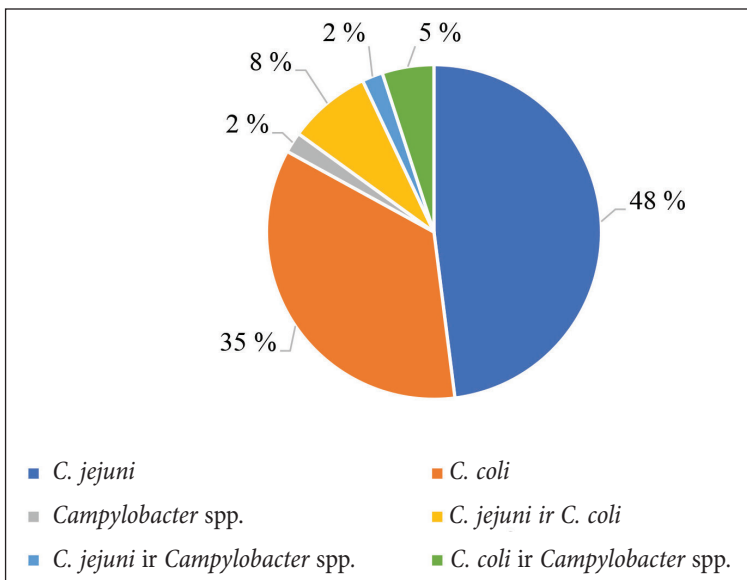
Tyrimo rezultatai parodė, kad iš viso kampilobakterijomis buvo užkrėsti 36 vnt. (26,1 %) mėginių – 19 vnt. atvėsintų sparnelių (27,9 %) ir 17 vnt. atvėsintų blauzdelių (24,3 %). Estijoje 2012 m. nustatyta, kad 20,8 % mažmeninėje rinkoje parduodamų broilerių produktų užkrėsti kampilobakterijomis (Maesaar et al., 2014). Lenkijoje 2017 m. buvo atliktas tyrimas ir nustatyta, kad iš 70 vištienos mėginių 49 % buvo užkrėsti *Campylobacter* spp. (Szosland-Fałtyn et al., 2018). Lyginant mūsų tyrimo gautus rezultatus, galima matyti, kad Lietuvoje parduodamų importuotų broilerių produktų užkrėstumas kampilobakterijomis yra labai panašus kaip Estijos mažmeninėje rinkoje, tačiau 1,9 karto mažesnis nei Lenkijoje. Tokie skirtumai gali būti susiję su tuo, kad šalys, importuojančios produkciją į kitas šalis, stengiasi užtikrinti aukščiausią kokybę. Kiekvienais metais gali skirtis broilerių pulkų užkrėstumas ir kampilobakterijų paplitimas, dėl to mokslinių tyrimų, atliktų skirtingais metais, rezultatai gali skirtis.

Kampilobakterijų, išskirtų iš importuotų broilerių blauzdelių ir sparnelių, rūšinė įvairovė buvo nustatyta atlikus dauginį PGR metodą. Išanalizavus kampilobakterijų rūšinį pasiskirstymą importuotoje broilerių produkcijoje, dažniausiai buvo aptiktos *C. jejuni* ir *C. coli* rūšys (1 pav.). *C. jejuni* sudarė 48 %, o *C. coli* – 35 % visų kampilobakterijų, identifikuotų importuotoje broilerių produkcijoje. Airijoje taip pat buvo tirta kampilobakterijų rūšinė įvairovė vištienoje ir gauti panašūs rezultatai: *C. jejuni* buvo aptikta dažniau (64,6 %) nei *C. coli* (27,4 %) (Moran et al., 2009). Mūsų atliktas tyrimas atskleidė, kad dalis broilerių mėginių (15 %) buvo užkrėsti daugiau nei viena kampilobakterijų rūšimi.

### 2 lentelė. Virulentiškumo genų pradmenų poros

Table 2. Primer pairs of virulence genes

Genas Gene	DNR seka DNR sequence	PGR produkto ilgis Length of PCR product
<i>CeuE</i>	F – CCTGCTCGGTGAAAGTTTTC R – GATCTTTTTGTTTTGTGCTGC	794 bp
<i>CadF</i>	F – TTGAAGGTAATTTAGATATG R – CTAATACCTAAAGTTGAAAC	400 bp
<i>CdtA</i>	F – GGAAATTGGATTTGGGGCTATACT R – ATCACAAGGATAATGGACAAT	165 bp



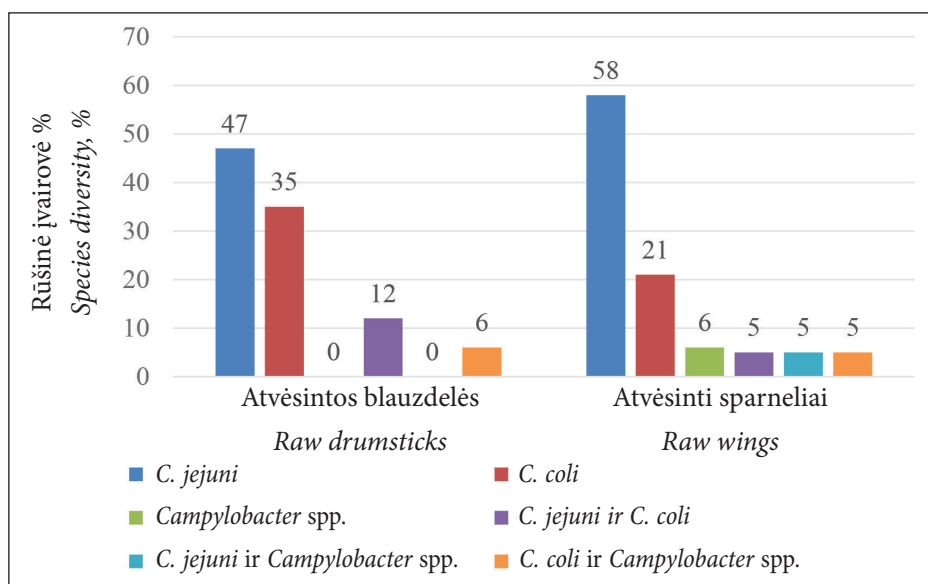
1 pav. Kampilobakterijų rūšinis pasiskirstymas importuotoje vištienoje

Fig. 1. Distribution of *Campylobacter* species among imported chicken

Kampilobakterijų rūšinė įvairovė, identifikuota tarp padermių, išskirtų nuo atvėsintų broilerių sparnelių, skyrėsi nereikšmingai, palyginti su padermėmis, išskirtomis nuo atvėsintų broilerių blauzdelių. Dažniausiai produktai buvo užkrėsti *C. jejuni* (atvėsintos blauzdelės – 47 %, sparneliai – 58 %) ir *C. coli* (atvėsintos blauzdelės – 35 %, sparneliai – 21 %) kampilobakterijų rūšimis (2 pav.). Statistinė analizė parodė, kad broilerių

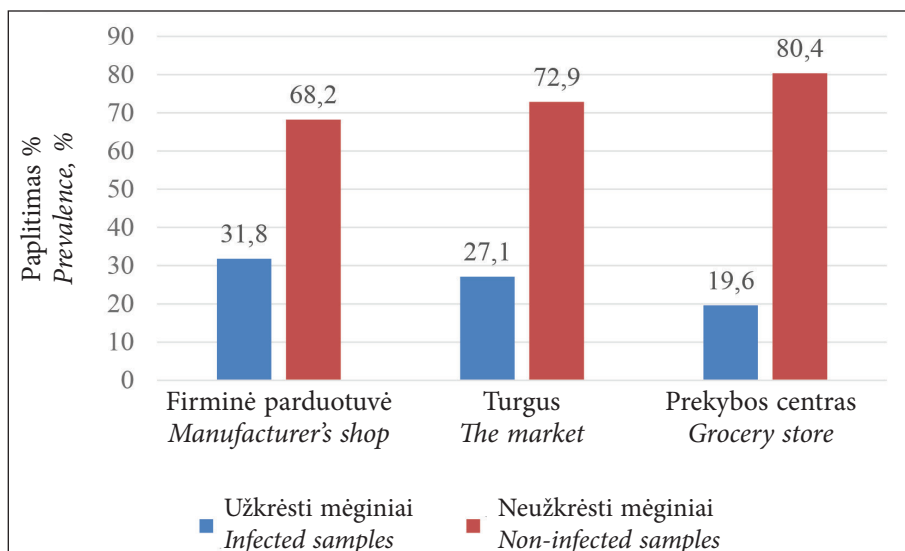
produktų (sparnelių ar blauzdelių) užkrėstumas kampilobakterijomis nepriklausė nuo broilerio produkto rūšies ( $p = 0,137$ ).

Kampilobakterijų paplitimas broilerių produktuose buvo įvertintas atsižvelgiant ir į skirtingas pardavimo vietas. Didžiausias (31,8 %) kampilobakterijų paplitimas buvo broilerių produktų mėginiuose iš firminės parduotuvės, o mažiausias (19,6 %) – iš prekybos centro (3 pav.). Skirtumas



2 pav. Kampilobakterijų, išskirtų iš atvėsintų sparnelių ir blauzdelių, rūšinė įvairovė

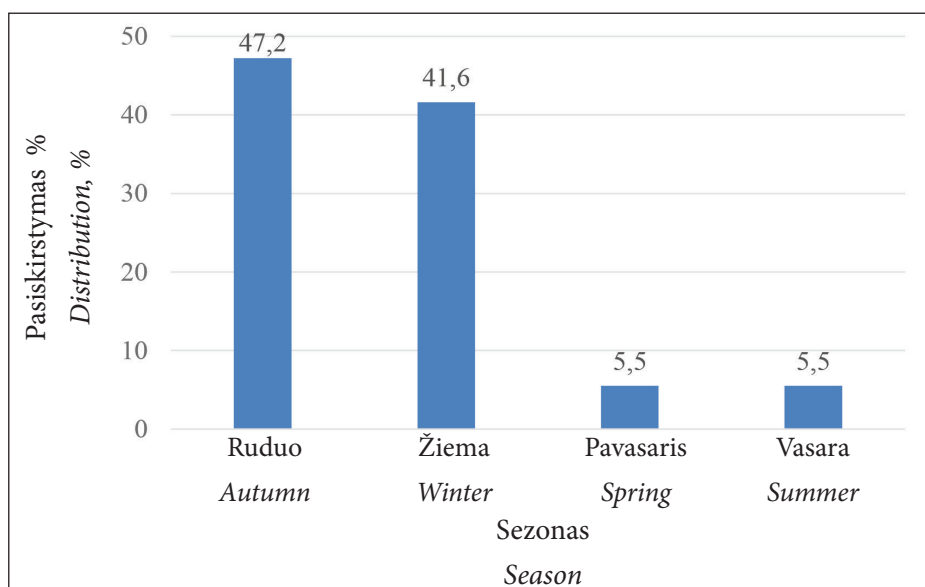
Fig. 2. Species diversity of *Campylobacter* detected among raw wings and drumsticks



**3 pav.** Kampilobakterijų paplitimas skirtingų pardavimo vietų mėginiuose  
*Fig. 3. Prevalence of Campylobacter among samples at different points of sale*

tarp firminės parduotuvės, kurioje rasta daugiausia užkręstų mėginių, ir prekybos centro, kuriame tokių rasta mažiausia, yra 12,2 %. Remiantis šiais rezultatais, galime daryti prielaidą, kad firminėje parduotuvėje galėjo būti prasčiau laikomasi higienos reikalavimų arba produkcija buvo prastesnės mikrobiologinės kokybės. Atlikus statistinę analizę ir įvertinus visų prekybos vietų įtaką broilerių produktų užkręstumui paaiškėjo, kad pardavimo vieta neturėjo įtakos broilerių produktų užkręstumui kampilobakterijomis ( $p = 0,067$ ).

Broilerių produktų užkręstumui kampilobakterijomis įtakos turėjo sezonas. Dažniausiai kampilobakterijos buvo aptiktos rudens (rugsėjo–lapkričio mėn.) ir žiemos (gruodžio–vasario mėn.) laikotarpiais (4 pav.). Iš 36 vnt. užkręstų mėginių rudenį kampilobakterijos buvo išskirtos iš 17 vnt. (tai sudaro 47,2 %), žiemą – iš 15 vnt. (41,6 %). Pavasario (kovo–gegužės mėn.) ir vasaros (birželio–rugsėjo mėn.) laikotarpiais aptikta po 2 vnt. kampilobakterijomis užkręstų mėginių (5,5 %). Skirtumas tarp užkręstų broilerių produktų rudens



**4 pav.** Kampilobakterijomis užkręstų vištienos mėginių pasiskirstymas pagal sezoną  
*Fig. 4. Seasonal distribution of Campylobacter spp. contaminated chicken samples*

ir žiemos sezonais buvo 5,6 %. Pavasarį ir vasarą buvo nustatyta 41,7 % mažiau užkrėstų broilerių produktų nei rudenį ir 36,1 % mažiau nei žiemą. Vakarų šalyse, esančiose vidutinio klimato juostoje, didesnis kampilobakterijų paplitimas vištienoje pastebimas vasarą (liepos–rugpjūčio mėn.) (Wagenaar et al., 2013). Iš Turkijoje atlikto tyrimo rezultatų matyti, kad didesnis *C. jejuni* ir *C. coli* paplitimas (77,3 %) šalyje parduodamoje vištienoje irgi buvo vasarą (birželio–rugpjūčio mėn.), o mažiausias (30 %) nustatytas vasario mėn. (Ozbej, 2014). Statistiškai įvertinus gautus duomenų rezultatus nustatyta, kad broilerių produktų užkrėstumas kampilobakterijomis priklausė nuo sezono ( $p = 0,001$ ).

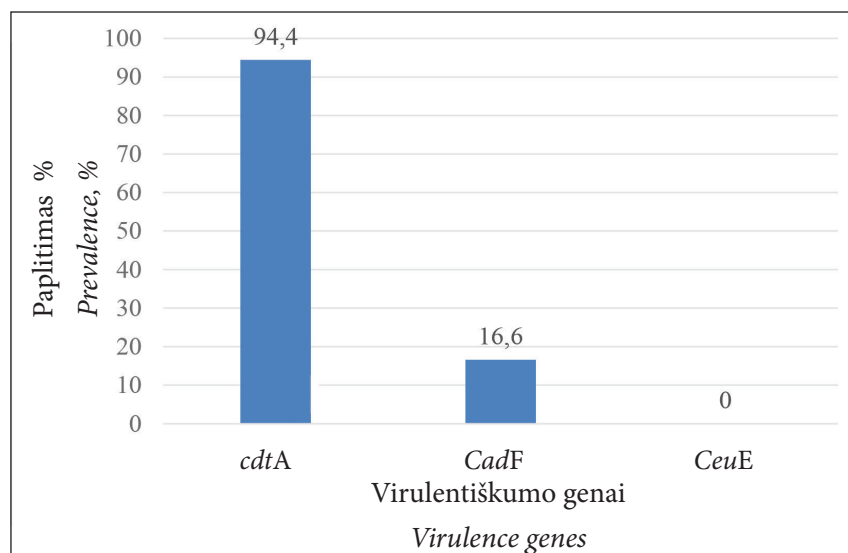
Virulentiškumo tyrimui buvo parinkti trys genai: *CeuE*, *CadF* ir *cdtA*, iš kurių tyrimo metu buvo aptikti tik du – *CadF* ir *cdtA* (5 pav.). Šių genų paplitimas buvo tiriamas tik *C. jejuni* ir *C. coli* padermėse. Didesnis paplitimas buvo nustatytas *cdtA* geno (94,4 %), atsakingo už citotoksinų gamybą. *CadF* virulentiškumo geno, vaidinančio svarbų vaidmenį *Campylobacter* infekcijos proceso metu šiai bakterijai prisijungiant prie žmogaus žarnyno ląstelių matricos (Reddy, Oliver, 2018), paplitimas mūsų tirtose kampilobakterijų padermėse buvo daug mažesnis (16,6 %). Atsižvelgiant į virulentiškumo genų paplitimo rezultatus galima daryti prielaidą, kad didžioji dalis (94,4 %) kampilobakterijų padermių geba gaminti citotoksinius, nes aptiktas *cdtA* genas.

Lenkijoje 2014–2016 m. buvo tiriami *C. jejuni* padermių, išskirtų iš paukštienos, virulentiškumo veiksniai. *CadF* genas buvo rastas visuose vištienos mėginiuose, o *cdtA* genas – 96 % mėginių (Wieczorek et al., 2018). Palyginus K. Wieczoreko ir kitų tyrimo rezultatus su gautais mūsų darbe, matyti, kad kampilobakterijų padermių, išskirtų iš broilerių produktų, savybė prisijungti prie žarnyno epitelinių ląstelių yra silpniau išsivysčiusi, o kampilobakterijų gebėjimas gaminti toksinus pasitvirtino tiriant beveik visas kampilobakterijų padermes.

## IŠVADOS

1. Atlikus vienerių metų epidemiologinį importuotų broilerių produktų užkrėstumo kampilobakterijomis tyrimą nustatyta, kad 26,1 % produkcijos užkrėsta kampilobakterijomis. Atvėsintų broilerių produktų (sparnelių ir blauzdelių) užkrėstumas kampilobakterijomis buvo pasiskirstęs panašiai – užkrėsta 27,9 % sparnelių ir 24,2 % blauzdelių ( $p = 0,137$ ).

2. Daugiausia kampilobakterijomis užkrėstų broilerių produktų aptikta firminėje parduotuvėje (31,8 %), o prekybos centre įsigytuose broilerių produktuose kampilobakterijų paplitimas buvo mažiausias – 19,6 %. Statistiškai įvertinus broilerių produktų užkrėstumą kampilobakterijomis skirtingose pardavimo vietose nustatyta, kad pardavimo vieta neturėjo reikšmingos įtakos broilerių produktų užkrėstumui šiomis bakterijomis ( $p = 0,067$ ).



5 pav. Virulentiškumo genų paplitimas *C. jejuni* ir *C. coli* padermėse  
Fig. 5. Prevalence of virulence genes in *C. jejuni* and *C. coli* strains

3. Apibendrinamos tyrimo rezultatus galime teigti, kad importuotuose broilerių sparneliuose ir blauzdelėse dažniausiai paplitusios *Campylobacter* spp. rūšys buvo *C. jejuni* (48 %) ir *C. coli* (35 %), o 15 % tirtų mėginių buvo užkrėsti daugiau nei viena kampilobakterijų rūšimi.

4. Tyrimo metu nustatytas didelis virulentiškumo geno *cdtA* paplitimas. 94,4 % tirtų kampilobakterijų padermių turėjo geną, kuris yra atsakingas už citotoksinų gamybą. *CadF* virulentiškumo geno, vaidinančio svarbų vaidmenį *Campylobacter* infekcijos proceso metu šiai bakterijai prisijungiant prie žmogaus žarnyno ląstelių matricos, paplitimas buvo daug mažesnis (16,6 %).

Gauta 2021 02 23

Priimta 2021 07 30

## LITERATŪRA

- Bang D. D., Møller Nielsen E., Scheutz F., Pedersen K., Handberg K., Madsen M. 2003. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 94. No. 6. P. 1003–1014.
- Bunevičienė J., Kudirkienė E., Ramonaitė S., Malakauskas M. 2010. Occurrence and numbers of *Campylobacter* spp. on wings and drumsticks of broiler chickens at the retail level in Lithuania. *Veterinary Medicine and Zootechnics*. Vol. 50. No. 72. P. 9–14.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*. Vol. 16. No. 12. P. e05500.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. Vol. 17. No. 12. P. e05926.
- Gokben O., Bulent T. 2014. Seasonality and antibiotic resistance of *Campylobacter* in Turkish chicken meat. *Veterinaria Italiana*. Vol. 50. No. 4. P. 277–283.
- González-Domínguez M., Méndez-Carro C., Cerdán M. E. 1997. Isolation and characterization of the KIH1 gene in *Kluyveromyces fragilis*. *Yeast (Chichester, England)*. Vol. 13. No. 10. P. 961–971.
- Kairytė A. 2018. *Didėja paukštienos importas iš kitų ES šalių*. VĮ Žemės ūkio informacijos ir kaimo verslo centras [žiūrėta 2020-01-18]. Prieiga per internetą: <http://www.vic.lt/zumpris/2018/06/12/2018-06-12-dideja-paukstienos-importas-is-kitu-es-saliu/>
- Kudirkienė E., Malakauskas M., Malakauskas A., Bojesen A. M., Olsen J. E. 2010. Demonstration of persistent strains of *Campylobacter jejuni* within broiler farms over a 1-year period in Lithuania. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 108. P. 868–877.
- Mäesaar M., Praakle K., Meremäe K., Kramarenko T., Sögel J., Viltrop A., Muutra K., Kovalenko K., Matt D., Hörman A., Hänninen M. L., Roasto M. 2014. Prevalence and counts of *Campylobacter* spp. in poultry meat at retail level in Estonia. *Food Control*. Vol. 44. P. 72–77.
- Meunier M., Guyard-Nicodème M., Dory D., Chemaly M. 2016. Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 120. No. 5. P. 1139–1173.
- Moran L., Scates P., Madden R. H. 2009. Prevalence of *Campylobacter* spp. in raw retail poultry on sale in Northern Ireland. *Journal of Food Protection*. Vol. 72. No. 9. P. 1830–1835.
- Nielsen H., Steffensen R., Ejertsen T. 2012. Risk and prognosis of campylobacteriosis in relation to polymorphisms of host inflammatory cytokine genes. *Scandinavian Journal of Immunology*. Vol. 75. No. 4. P. 449–454.
- Reddy S., Zishiri O. T. 2018. Genetic characterisation of virulence genes associated with adherence, invasion and cytotoxicity in *Campylobacter* spp. isolated from commercial chickens and human clinical cases. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. Vol. 85. No. 1. P. e1–e9.
- Skarp C. P. A., Hänninen M. L., Rautelin H. I. K. 2016. Campylobacteriosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Vol. 22. No. 2. P. 103–109.
- Szosland-Fałtyń A., Bartodziejska B., Królasik J., Paziak-Domańska B., Korsak D., Chmiela M. 2018. The prevalence of *Campylobacter* spp. in Polish poultry meat. *Polish Journal of Microbiology*. Vol. 67. No. 1. P. 117–120.
- Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras. 2019. *Sergamumas užkrečiamomis ligomis*. 4p. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per internetą: [http://www.ulac.lt/uploads/downloads/Ataskaitos/2019/Forma4\\_2019.pdf](http://www.ulac.lt/uploads/downloads/Ataskaitos/2019/Forma4_2019.pdf)
- Wagenaar J., Nigel A., French P., Havelaar A. H. 2013. Preventing *Campylobacter* at the source: Why is it so difficult? *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. Vol. 57. No. 11. P. 1600–1606.
- Wang G., Clark C. G., Taylor T. M., Pucknell C., Barton C., Price L., Woodward D. L., Rodgers F. G. 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp.



- fetus. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 40. No. 12. P. 4744–4747.
19. Wiczorek K., Wołkowicz T., Osek J. 2018. Anti-microbial resistance and virulence-associated traits of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry food chain and humans with diarrhea. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 9. P. 1508.
  20. Wysok B., Wojtacka J. 2018. Detection of virulence genes determining the ability to adhere and invade in *Campylobacter* spp. from cattle and swine in Poland. *Microbial Pathogenesis*. Vol. 115. P. 257–263.

Dominyka Baltutyte, Laura Babonyte, Sigita Ramonaitė

### PREVALENCE OF *CAMPYLOBACTER* SPP. AMONG IMPORTED BROILER DRUMSTICKS AND WINGS SOLD IN LITHUANIA

#### *S u m m a r y*

The aim of this research was to estimate the prevalence of *Campylobacter* in imported broiler drumsticks and wings.

During the one-year study period, 138 imported broiler samples (raw wings and drumsticks) were collected and tested from 3 different sellers. *Campylobacter* spp. were detected and isolated using traditional microbiological methods, identified using a multiplex polymerase chain reaction (PCR) method. The results of PCR products were analysed in agarose gel using electrophoresis. After an epidemiological study, *C. jejuni* and *C. coli* strains were selected and the prevalence of virulence genes was evaluated.

The study identified *Campylobacter* spp. in 36 (26.1%) samples – 19 raw wings (27.9%) and 17 raw drumsticks (24.3%) samples were infected with these bacteria. *Campylobacter* spp. were most frequently detected in raw broiler samples during autumn (September–November) (47.2%) and winter (December–February) (41.6%) periods than spring (March–May) (5.5%) or summer (June–August) (5.5%). Contamination of products was not significantly impacted by the sale location ( $p > 0.05$ ).

The examination of virulence factors of *Campylobacter* spp. revealed that *C. jejuni* and *C. coli* strains contain 2 out of 3 virulence genes – *CadF* and *CdtA*. The *CdtA* gene was found in nearly all tested *Campylobacter* spp. strains isolated from broiler samples (94.4%).

**Keywords:** *Campylobacter* spp., imported broiler products, prevalence, virulence, contamination