



ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК: 619:579.842.14:577.212.3

DOI: 10.17238/issn2072-2419.2019.4.9

СПЕКТР ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СЕРОВАРИАНТОВ САЛЬМОНЕЛЛ В ПТИЦЕВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ

Семина А.Н. – к.в.н., вед. науч. сотрудник.
«Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» - филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН (ВНИВИП).

Ключевые слова: птица, сальмонелла, ПЦР, праймеры, серовариант, проба **Key words:** poultry, Salmonella, PCR, primers, serovar, sample.



РЕФЕРАТ

Сальмонеллёз, как зооантропонозная инфекция, продолжает оставаться одной из актуальных проб современного птицеводства. Среди выделенных в РФ серотипов сальмонелл, доминирующую позицию занимает *Salmonella enteritidis*, за ней следуют *Salmonella typhimurium* и *Salmonella infantis*. Характерной особенностью данного заболевания у птиц является то, что переболевшие особи продолжают выделять возбудителя в окружающую среду и представляют таким образом серьёзную опасность для потребителей, так как человеческий организм чрезвычайно восприимчив к сальмонеллам.

Основной задачей наших исследований являлось изучить спектр циркулирующих серовариантов сальмонелл в птицеводческих хозяйствах. С этой целью были проведены обследования различного биологического материала как от живой птицы так и от павшей. Всего было исследовано 200 различных образцов из 7 птицефабрик. Выявление и генотипирование возбудителей сальмонеллёза птиц проводили, используя молекулярно-биологический метод – ПЦР. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) обладает рядом преимуществ поскольку сочетает в себе быстроту и простоту исполнения, а также потенциально высокую специфичность и чувствительность при выявлении патогенных микроорганизмов. Для проведения данной реакции были использованы специфичные праймеры разработанные нами ранее.

В результате исследований было установлено, что наличие в продуктах ПЦР фрагмента ДНК длиной 500 п.н. свидетельствует о присутствии в исследуемом материале ДНК *S.enteritidis*, а фрагмента ДНК длиной 250 п.н. для ДНК *S.typhimurium*. Наличие в пробе ДНК сероварианта *S.infantis* подтверждается выявлением фрагмента длиной 324 п.н. Получение результаты исследования показали, что серовариант *S.enteritidis* выявлен в 54 образцах, *S.typhimurium* 33 образцах, а серовариант *S.infantis* в 32 образцах.

ВВЕДЕНИЕ

Продолжающийся рост заболеваемости сальмонеллёзами во многих странах, увеличение числа серовариантов сальмонелл, обнаруживаемых у птиц, животных и у людей, значительная контаминация сальмонеллами пищевых продуктов животного происхождения и объектов внешней среды, выдвигают эту инфекцию в ряд важнейших не только ветеринарных, но и медико-экологических и социальных проблем [1,3].

Для промышленного птицеводства решение проблемы сальмонеллёзов имеет особое значение, так как именно эта отрасль производит диетическую, легко усваиваемую продукцию. Заболевание птицы сальмонеллёзом часто протекает бессимптомно [2,5]. Сальмонелла, являясь обитателем кишечника, может контаминировать скорлупу яиц и тушки птицы при убое, часто при неправильном хранении и некачественно переработке может привести к тяжёлому заболеванию людей [4].

Целью настоящей работы явилось определить спектр циркулирующих серовариантов сальмонелл в птицеводческих хозяйствах, представляющие особую опасными для людей с использованием молекулярно-биологического метода, основанного на ПЦР электрофоретической детекции и секвенировании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Биоматериал. Материал от каждой птицы отбирался отдельными инструментами. Для исследования использовали: 1) фекалии отбирали в стерильные контейнеры в количестве 5-10 г; 2) мазки со слизистой прямой кишки брали сухими стерильными зондами с ватными тампонами. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещали в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл стерильного физиологического раствора или раствора фосфатного буфера. Конец зонда отламывали, с расчётом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки.

Патологический (паренхиматозные органы, желудок, кишечник) материал для выделения серовариантов сальмонелл

брали от павшей птицы разных возрастов.

Штаммы микроорганизмов. В работе использовали штаммы микроорганизмов *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*, полученные из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института птицеводства в отделе микробиологии.

Выделение ДНК из биоматериала проводили при помощи коммерческого набора «ДНК-сорб» (ЦНИИ эпидемиологии, Россия).

Реакционная смесь при постановке ПЦР, объемом 25 мкл, была следующего состава: 5,0 мкл ПЦР-смеси ScreenMix, содержащая Taq ДНК-полимеразу; смесь нуклеотидтрифосфатов, с концентрацией 0,2 мМ каждого нуклеотида; 2,0 мМ Mg²⁺; красный и желтый красители; по 1,0 мкл прямого и обратного праймера; 13,5 мкл деионизированной воды. Использовали следующие температурные режимы: начальная денатурация 95 °С-5 мин-1 цикл; 39 циклов: 95°С-15 сек, 55 °С-20 сек, 72 °С-15 сек.

ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Россия).

Анализ фрагментов ПЦР проводили методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации 0,5 мкг/мл. Гели фотографировали и анализировали, используя трансиллюминатор с ультрафиолетовым светом с длиной волны 245 нм.

Для определения размера фрагмента ДНК использовали маркер молекулярного веса длиной от 150-1500 п.н.

Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов генов SEFA-1, SEFA-2 *S. enteritidis* и гена *Inv-1*, *Inv-2* *S. typhimurium*, а также генов *fimA-1*, *fimA-2* сероварианта *S. infantis* проводили с использованием праймеров и набора «DYEnamic ET terminator kit». Продукты реакции секвенирования анализировали методом капиллярного электрофореза в автоматическом секвинаторе MegaBase.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во ВНИВИП проводились молекулярно-генетические исследования по выявле-

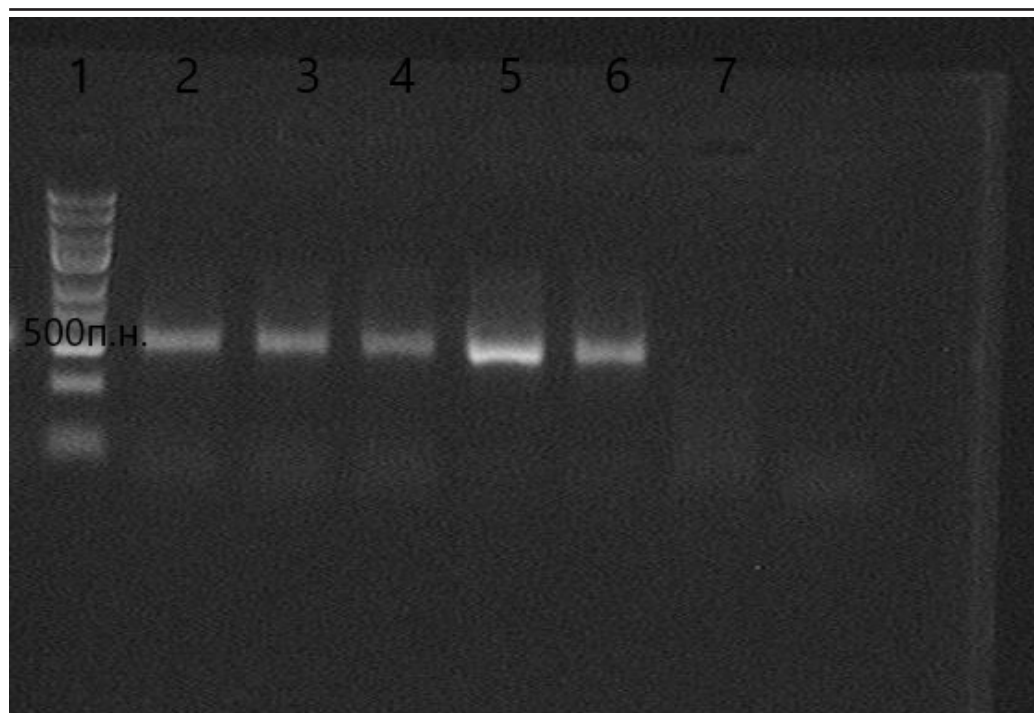


Рис. 1. Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента генома *S.enteritidis* исследуемом материале.
1 - маркер молекулярной массы; 2-5 - положительные пробы; 6 – положительный контроль выделения; 7 – отрицательный контроль выделения.

нию и генетипированию различных серовариантов сальмонелл с 2018 г. За период 2018-2019 гг. с помощью ПЦР и геномного секвенирования, на птицефабриках РФ, нами было исследовано 200 проб биологического материала на сероварианты сальмонелл, такие как *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*. По результатам исследования было выявлено в 54 пробах серовариант *S.enteritidis*, 33 пробах серовариант *S.typhimurium* и 32 пробе серовариант *S.infantis*.

Для детекции генов SEFA-1, SEFA-2 и гена *Inv-1*, *Inv-2*, а также генов *fimA-1*, *fimA-2* использовали разработанные образцы уникальных олигонуклеотидных последовательностей праймеров, специфичных к *S.enteritidis*, *S.typhimurium*, *S.infantis* для их обнаружения в полимерно-цепной реакции, депонированных в

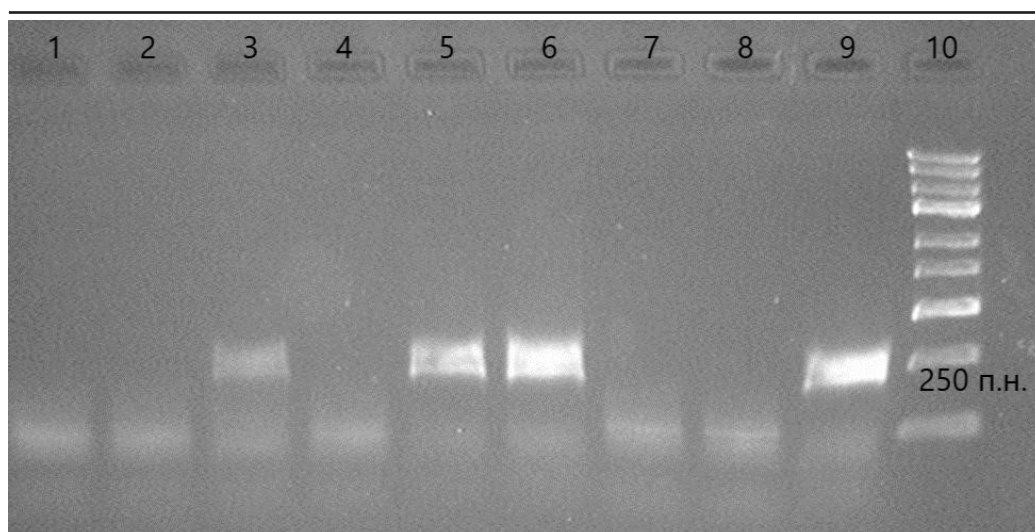
международной базе данных NCBI Gene-Bank.

При постановке ПЦР, на этапе выделения ДНК, использовали отрицательный и положительный контроль реакции. В качестве положительного контроля использовали штаммы микроорганизмов *S.enteritidis*, *S.typhimurium*, *S.infantis*, полученные из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института птицеводства в отделе микробиологии.

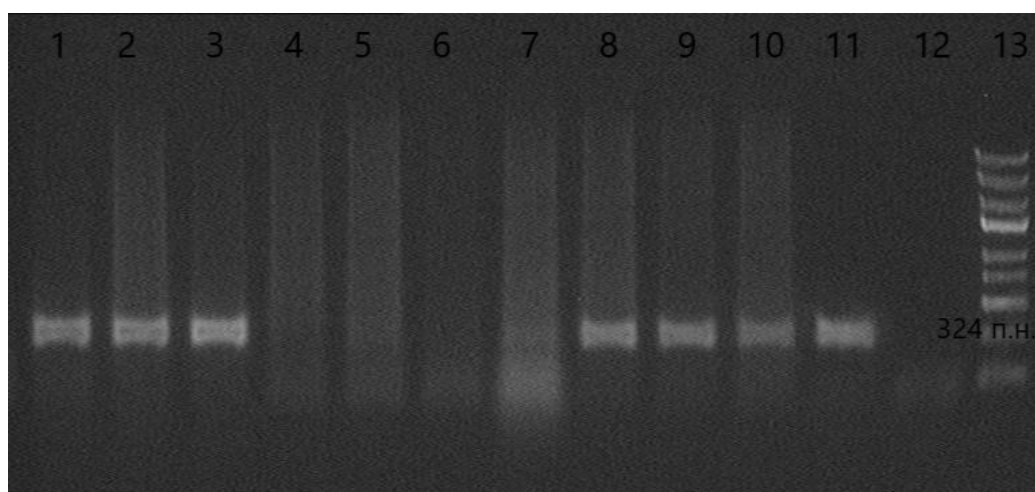
В результате ПЦР, проведенной с исследуемым биологическим материалом был зарегистрирован фрагмент длиной 500 п.н., что свидетельствует о наличии сероварианта *S.enteritidis* (рис. 1).

Фрагмент ДНК длиной 250 п.н., характерный для сероварианта *S.typhimurium* (рис. 2).

Регистрация фрагмента длиной 324 п.н. указывала на наличие сероварианта *S.infantis* (рис. 3).



*Рис. 2. Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента генома *S.typhimurium* исследуемом материале. 1,2,4,7 - отрицательные пробы; 3,5,6 – положительные пробы; 9 - положительный контроль выделения; 8 – отрицательный контроль выделения; 10 - маркер молекулярной массы*



*Рис. 3. Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента генома *S.infantis* исследуемом материале. 4-7 - отрицательные пробы; 1,2,3,8,9,10 - положительные пробы; 11 - положительный контроль выделения; 12 - отрицательный контроль выделения; 13 - маркер молекулярной массы*

Таким образом, изучая спектр циркулирующих серовариантов сальмонелл в птицеводческих хозяйствах было выявлено, что наиболее часто встречаемым серовариантом является *S. enteritidis* следующие за ней сероварианты *S. typhimurium* и *S. infantis* встречаются примерно с одинаковой частотой выделения.

Исходя из полученных исследований можно сделать вывод, о том, что такое заболевание как сальмонеллез остается актуальной проблемой птицеводства. Учитывая то факт что данное заболевание представляет особую опасность для людей, необходимо проводить обследование птицеводческих хозяйств, которое бы позволило своевременно выявлять бактерионосителей и не допускать обсеменённости продуктов животного происхождения. Одним из таких методов исследования данного заболевания является метод с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР), зарекомендовавший себя как один из самых высокочувствительных и специфичных методов диагностики.

Variety range of circulating salmonella serotypes in poultry farms. Semina A.N. – PhD of vet.scie, leading researcher, "All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science" - Branch FNTS "VNITIP" RAS (VNIVIP).

ABSTRACT

Salmonellosis, as zooantroponoze infection, continues to be one of the actual problem of modern poultry. Among the *Salmonella* serotypes isolated in Russia, *Salmonella enteritidis* occupies a dominant position, followed by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella infantis*. A characteristic feature of this disease in birds is that the infected individuals continue to release the pathogen into the environment and thus pose a serious danger to consumers, since the human body is extremely susceptible to *Salmonella*.

The main objective of our research was to study the variety range of circulating *Salmonella* serovariants in poultry farms. Samples for assay were received from various biological material from alive and dead birds.

A total of 200 different samples from 7 poultry farms were examined. Detection and genotyping of causative agents of avian salmonellosis was carried out using molecular biological method – polymerase chain reaction. Polymerase chain reaction (PCR) has several advantages because it combines speed and ease of execution, as well as potentially high specificity and sensitivity. For this reaction, specific primers developed by us earlier were used.

As a result of the research, it was found presence of a specific DNA fragment with a length of 500 BP, that indicates the presence in the studied material of *S. enteritidis* DNA, and a DNA fragment with a length of 250 BP for *S. typhimurium* DNA. The presence of serovariant *S. infantis* in the DNA sample is confirmed by the detection of a fragment length of 324 BP. The results of the study showed that serovariant *S. enteritidis* were detected in 54 samples, *S. typhimurium* 33 samples, and serovariant *S. infantis* in 32 samples.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новикова О.Б. Микрофлора, выделяемая в птицеводческих хозяйствах различного технологического направления и контроль бактериальных болезней птиц / Новикова О.Б., Павлова М.А. // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2018. – № 3. – С. 34–36.
2. Новикова О.Б. Инфекция птиц сальмонелла-энтеритидис / Новикова О.Б., Борисенкова А.Н. // Журнал «БИО». – 2015. – № 3. – С. 20.
3. Смирнова Л.И. Санитарно-микробиологический контроль объектов внешней среды / Смирнова Л. И., Сухинин А. А., Приходько Е. И., Белкина И. В. Макавчик С. А. // Санкт-Петербург – 2016. – С. 84.
4. Сухинин А.А. Практикум по общей ветеринарной микробиологии / Сухинин А.А., Тулева Н.П., Белкина И.В., Смирнова Л.И., Бакулин В.А., Приходько Е.И., Макавчик С.А., Виноходов В.О. // Санкт-Петербург – 2016. – С. 100.
5. Rapid outbreak assessment. Unusual increase of *Salmonella* Mikawasima infections in humans // European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 28 November 2013. – P. 1–9.