

УДК 619:579:842.14

Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент

Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук

Дубаневич О.В., старший научный сотрудник

Стрельчenea И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск

**БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУЗЕЙНЫХ ШТАММОВ *SALMONELLA DUBLIN*,
SALMONELLA CHOLERAЕ SUIС, *SALMONELLA TYPHIMURIUM*****Резюме**

В статье приведены данные по биохимическим свойствам музейных штаммов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*, установлены отличительные особенности ферментирования отдельных веществ. Серовариантная принадлежность музейных штаммов подтверждена в полимеразной цепной реакции с помощью разработанных РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского» тест-систем для обнаружения геномов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*.

Summary

The article presents data on the biochemical properties of the museum strains of *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*, distinguishing features of the fermentation of individual substances are established. Serovariate accessories of the museum strains were confirmed in the polymerase chain reaction using the developed by RUE «Institute of Experimental Veterinary Medicine named after S.N. Vysheselskogo» test systems for the detection of the genomes of *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*.

Поступила в редакцию 25.05.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Сальмонеллез остается серьезной социально-экономической проблемой для большинства стран мира. В настоящее время во всех экономически развитых странах, в том числе в Республике Беларусь и России, сальмонеллез распространен повсеместно, а заболеваемость им не имеет устойчивой тенденции к снижению [1, 2]. Рост заболеваемости сальмонеллезом совпадает с широким развитием животноводства, звероводства и птицеводства. Все это определяет актуальность проблемы.

В условиях повсеместного распространения сальмонеллеза особую озабоченность вызывает отсутствие эффективных методов предупреждения болезни. При интенсификации производства продуктов животноводства требуются новые критерии для диагностики сальмонеллеза [3].

Определение видовой принадлежности штаммов, а также подтверждение их аутентичности (установление подлинности по свойствам, заявленным в паспорте на момент поступления) в процессе воспроизводства с учетом требований современной систематики бактерий является одним из важных направлений деятельности группы коллекции микроорганизмов [4].

Традиционно установление таксономической принадлежности микроорганизмов основывается на изучении их морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных, антигенных и генетических свойств. Ключевым тестом при определении аутентичности является изучение биохимической активности патогена с использованием комбинированных (комплексных) сред Клиглера, Олькеницкого, Ресселя, Кларка, Гисса и коммерческих тест-систем: системы инди-

каторные бумажные – СИБ (Нижний Новгород), АПИ стрипы – API® (Bio-Mérieux, Франция) и др. [5, 6]. Это не всегда позволяет окончательно идентифицировать некоторые бактерии до вида, что является необходимым при включении их штаммов в коллекционный фонд. Нередки случаи, когда бактерия, идентифицированная по фенотипическим свойствам определенным видом, оказывается при более детальном изучении иной видовой принадлежности [7].

Контроль соответствия паспортным данным особенно необходим при консервации и воспроизводстве референтных штаммов, используемых в производственной, диагностической и образовательной деятельности, свойства которых недостаточно изучены, т.к. их выделение и описание осуществлялось в различное время, большей частью в середине XX века, когда сведения о фенотипических свойствах носили фрагментарный характер [8].

В ряде случаев для правильной видовой идентификации требуется расширить перечень используемых субстратов с помощью микробиологического анализатора Vitek 2 (Bio-Mérieux, Франция), позволяющего одновременно изучать более 60 различных биохимических свойств бактерий.

Наиболее полно отвечает требованиям метод выявления ДНК возбудителя, основанный на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР). С помощью ПЦР удается обнаружить крайне малое количество сальмонелл, идентифицировать их на видовом и серогрупповом уровнях и подтвердить принадлежность какого-либо штамма к определенному серовару сальмонелл [9]. Разработаны отечественные тест-системы для детекции генома возбудителя *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin* [10, 11, 12].

Разработка новых современных методов экспресс-диагностики сальмонеллез и методов типирования сальмонелл является одним из важных моментов сдерживания распространения возбудителей болезни.

Цель работы – подтвердить принадлежность музейных штаммов *Salmonella*

dublin, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium* к определенному серовару сальмонелл и изучить их биохимические свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали суточные культуры музейных штаммов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», выращенные на сердечно-мозговом бульоне:

- штамм *Salmonella dublin* (КМИЭВ-B124) – штамм-антиген;
- штамм *Salmonella cholerae suis* (КМИЭВ-B126) – штамм-антиген;
- штамм *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ-B130) – штамм-антиген.

Восстановление бактериологических культур из леофильной сушки проводили следующим образом: флакон с сухой культурой обрабатывали 70°-ным спиртом, обжигали в пламени спиртовки, вскрывали резиновую пробку, растворяли культуру в 1–2 см³ сердечно-мозгового бульона (Brain Heart Infusion Broth фирмы Biolab, Венгрия) и вносили ее в бактериологическую пробирку с сердечно-мозговым бульоном. Культивировали в течение 18–24 часов при температуре от +37 до +38 °С.

Для изучения биохимических свойств музейных штаммов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium* суточные бульонные культуры пересеивали на сердечно-мозговой агар (Brain Heart Infusion Agar фирмы Biolab, Венгрия) и культивировали в чашках Петри диаметром 90 мм (фирма Бион, г. Минск) в термостате при температуре 37 °С в течение 18–24 часов.

Для оценки чистоты культуры готовили мазки, которые окрашивали по Граму с использованием готового набора красителей фирмы Sigma-Aldrich.

Исучаемую культуру в виде бактериальной суспензии изолированной колонии готовили в 3 см³ специального солевого раствора производства фирмы Biomerieux (кат. № V1204). Концентрацию измеряли прибором DensiCHEK plus фирмы Biomerieux.

Готовую суспензию с оптической плотностью 0,5–0,63 McF по шкале МакФарланда исследовали для изучения биохимических свойств на приборе Vitek 2 compact, используя кассеты Vitek 2 GN.

При постановке ПЦР были использованы: буфер 10x PCR для Tag ДНК-полимеразы (ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»), 10x TE-буфер pH 8,0 (SIGMA), TAE: трис ацетат, маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» (Fermentas, Литва), Taq-полимераза, 5 ед./мкл (ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»), раствор MgCl₂ (50 мМ), смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТП) (25 мМ) (Fermentas, Литва), агароза (helicon, Россия).

Для детекции геномов музейных штаммов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium* выделяли ДНК колоночным методом набором «ДНК-ВК» (ИБОХ, г. Минск). Амплификацию ДНК проводили в 23 мкл реакционной смеси с 2 мкл выделенной ДНК. Использовали оптимальные концентрации компонентов реакционной смеси: количество полимеразы 1,25 единицы, магния 2 мМоль и дНТП 0,2 мМоль.

Проведение ПЦР осуществляли, используя программу амплификации:

1. 94 °C – 3 мин;
2. 94 °C – 30 с;
3. 57 °C – 45 с;
4. 72 °C – 30 с;
- пункты 2–4 – повтор 40 циклов;
5. 72 °C – 6 мин;
6. 10 °C – условие хранения.

Результаты ПЦР регистрировали путем проведения электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в стандартном трис-ЭДТА буфере (pH 8,0) путем внесения 10 мкл продукта ПЦР в лунки агарозного геля. Электрофорез проводили при напряжении 60 В 80 минут. Результаты электрофореза учитывали на приборе Gel Doc XR и с помощью программы ImageLab Software. Результат ПЦР считали положительным, если продукт ПЦР, выражаемый в количестве нуклеотидных пар в соответствии с маркером молекулярного веса, соответствовал искомому фрагменту и составлял для *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium* соответственно 399, 244 и 122 нуклеотидных пары (рисунки 1, 2, 3).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные на приборе Vitek 2 compact данные по биохимическим свойствам музейных штаммов сальмонелл представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Биохимические свойства музейных штаммов *Salmonella Dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*

Тест	Сокращение	КМИЭВ-В-124	КМИЭВ-В-126	КМИЭВ-В-130
1	2	3	4	5
Ala-Phe-Pro-АРИЛАМИДАЗА	APPA	-	-	-
АДОНИТОЛ	ADO	-	-	-
L-пирролидонАРИЛАМИДАЗА	PyrA	-	-	-
L-АРАБИТ	IARL	-	-	-
D-ЦЕЛЛОБИОЗА	dCEL	-	-	-
БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗА	BGAL	-	-	-
ПРОДУКЦИЯ H ₂ S	H ₂ S	+	-	+
БЕТА-N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНИДАЗА	BNAG	-	-	-
Глютаминариламидаза pNA	AGLTp	-	-	-
D-ГЛЮКОЗА	dGLU	+	+	+
ГАММА-ГЛЮТАМИЛТРАНСФЕРАЗА	GGT	-	-	-
СБРАЖИВАНИЕ ГЛЮКОЗЫ	OFF	+	+	+

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
БЕТА-ГЛЮКОЗИДАЗА	BGLU	-	-	-
D-МАЛЬТОЗА	dMAL	+	+	-
D-МАННИТ	dMAN	+	+	+
D-МАННОЗА	dMNE	+	+	+
БЕТА-КСИЛОЗИДАЗА	BXYL	-	-	-
БЕТА-аланинариламидаза pNA	BAlap	-	-	-
L-пролинАРИЛАМИДАЗА	ProA	-	-	-
ЛИПАЗА	LIP	-	-	-
ПАЛАТИНОЗА	PLE	-	-	-
ТирозинАРИЛАМИДАЗА	TyrA	+	-	-
УРЕАЗА	URE	-	-	-
D-СОРБИТ	dSOR	+	+	+
САХАРОЗА	SAC	-	-	-
D-ТАГАТОЗА	dTAG	-	-	+
D-ТРЕГАЛОЗА	dTRE	+	-	+
ЦИТРАТ (НАТРИЯ)	CIT	+	+	+
МАЛОНАТ	MNT	-	-	-
5-КЕТО-D-ГЛЮКОНАТ	5KG	-	-	-
L-ЛАКТАТ, подщелачивание	ILATk	+	+	-
АЛЬФА-ГЛЮКОЗИДАЗА	AGLU	-	-	-
СУКЦИНАТ, подщелачивание	SUCT	+	+	-
Бета-N-АЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИНИДАЗА	NAGA	-	-	-
АЛЬФА-ГАЛАКТОЗИДАЗА	AGAL	+	-	+
ФОСФАТАЗА	PHOS	+	-	-
ГлицинАРИЛАМИДАЗА	GlyA	-	-	-
ОРНИТИНДЕКАРБОКСИЛАЗА	ODC	+	+	+
ЛИЗИНДЕКАРБОКСИЛАЗА	LDC	+	+	+
L-ГИСТИДИН, ассимиляция	IHISa	-	-	-
КУМАРАТ	CMT	+	+	+
БЕТА-ГЛЮКУРОНИДАЗА	BGUR	-	-	-
УСТОЙЧИВОСТЬ К 0/129 (вибриостат, агент)	O129R	+	+	+
Glu-Gly-Arg-АРИЛАМИДАЗА	GGAA	-	-	-
L-МАЛАТ, ассимиляция	IMLTa	-	-	-
ЭЛЛМАН	ELLM	-	-	-
L-ЛАКТАТ, ассимиляция	ILATa	-	-	-

Исходя из полученных данных, представленных в таблице 1, было установлено что:

- музейный штамм *Salmonella dublin* (КМИЭВ-B124) – штамм-антиген продуци-

рует H₂S, сбрасывает глюкозу, расщепляет D-глюкозу, D-мальтозу, D-маннит, D-маннозу, тирозинариламидазу, D-сорбит, D-трегалозу, альфа-галактозидазу, фосфатазу, орнитиндекарбоксилазу, лизинде-

карбоксилазу, кумарат. Подщелачивает L-лактат, сукцинат. Утилизирует цитрат (натрия). Обладает устойчивостью к 0/129 (вибриостат, агент);

- музейный штамм *Salmonella cholerae suis* (КМИЭВ-B126) – штамм-антиген сбраживает глюкозу, расщепляет D-глюкозу, D-мальтозу, D-маннит, D-маннозу, D-сорбит, орнитиндекарбоксилазу, лизиндекарбоксилазу, кумарат. Подщелачивает L-лактат, сукцинат. Утилизирует цитрат (натрия). Обладает устойчивостью к 0/129 (вибриостат, агент);

- музейный штамм *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ-B130) – штамм-антиген продуцирует H₂S, сбраживает глюкозу, расщепляет D-глюкозу, D-маннит, D-маннозу, D-сорбит, D-тагатозу, D-трегалозу, альфа-

галактозидазу, орнитиндекарбоксилазу, лизиндекарбоксилазу, кумарат. Утилизирует цитрат (натрия). Обладает устойчивостью к 0/129 (вибриостат, агент).

Однако на приборе Vitek 2 compact все три музейных штамма с вероятностью 97–99 % определились как *Salmonellas spp.* без указания серовариантной принадлежности.

В связи с необходимостью уточнения серовариантной принадлежности штаммов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*, использованных в исследованиях, была проведена полимеразная цепная реакция тест-системами для обнаружения геномов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium* (рисунки 1, 2, 3).



Рисунок 1. – Результаты амплификации с ДНК культур *Salmonella choleraesuis* (1), *Salmonella dublin* (2), *Salmonella typhimurium* (3), К- (4) амплификационная смесь для детекции *Salmonella dublin*

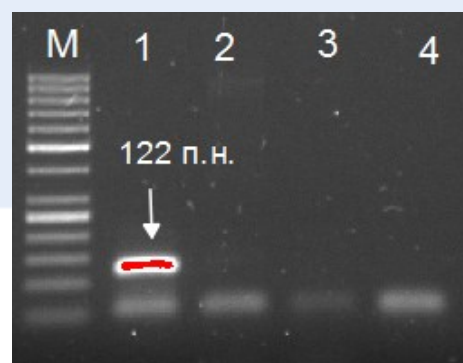


Рисунок 2. – Результаты амплификации с ДНК культур *Salmonella choleraesuis* (1), *Salmonella dublin* (2), *Salmonella typhimurium* (3), К- (4) амплификационная смесь для детекции *Salmonella typhimurium*



Рисунок 3. – Результаты амплификации с ДНК культур *Salmonella choleraesuis* (1), *Salmonella dublin* (2), *Salmonella typhimurium* (3), К- (4) амплификационная смесь для детекции *Salmonella choleraesuis*

Полученные данные указывают на то, что все исследуемые штаммы в ПЦР подтвердились и не давали перекрестных реакций между собой.

ВЫВОДЫ

1. Изучены биохимические свойства музейных штаммов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium* на приборе Vitek 2 compact.

2. В результате проведения ПЦР подтверждено, что:

- штамм *Salmonella dublin* (КМИЭВ-B124) – штамм-антиген содержит геном *Salmonella dublin*;

- штамм *Salmonella cholerae suis* (КМИЭВ-B126) – штамм-антиген содержит геном *Salmonella cholerae suis*;

- штамм *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ-B130) – штамм-антиген содержит геном *Salmonella typhimurium*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Современные особенности эпидемического процесса сальмонеллезов СССР / Б. Д. Черкасский [и др.] // Журнал микробиологии – 1991. – № 1. – С. 32–36.
2. Altekruze, S. F. The Changing Epidemiology of Foodborne Diseases / S. F. Altekruze, D. L. Swerdlov // Am. J. Med. Sci. – 1996. – Vol. 311. – № 1. – P. 23–29.
3. Тенденция развития эпидемического процесса сальмонеллезов, обусловленных *Salmonella typhimurium* и *Salmonella enteritidis* / В. И. Сергеев [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1990. – № 5. – С. 38–42.
4. Smith, D. Culture Collections / D. Smith // Microbiology. – 2012; 79:73–118. DOI: 10.1016/B978-0-12-394318-7.00004-8.
5. Биргер, М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М. О. Биргер. – М.: Медицина; 1982. – 464 с.
6. Лабинская, А. С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская, Л. П. Блинкова, А. С. Ещина. – М.: Медицина, 2004. – 576 с.
7. Леванова, Г. Ф. Фенотаксономия и геносистематика локтобацилл / Г. Ф. Леванова, Е. И. Ефимов. – Н. Новгород: изд. Ю.А. Николаев, 2009. – 248 с.
8. Белова, Л. Н. Биологические коллекции российской Федерации / Л. Н. Белова, В. Н. Мошенцева // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2013. – Т. 5. – С. 10–18.
9. Яцышина, С. Б. Выявление и типирование возбудителей сальмонеллеза молекулярно-генетическими методами: дис. ... канд. биол. наук / С. Б. Яцышина. – М., 2003. – 112 с.
10. Тяпша, Ю. И. Молекулярно-генетическая детекция генома *Salmonella cholerae suis* / Ю. И. Тяпша, О. В. Дубаневич, А. С. Андруевич // Ученые записки Витебск. гос. вет. акад. – Витебск, 2018. – Т. 54, вып. 2. – С. 67–72.
11. Тяпша, Ю. И. Молекулярно-генетическая детекция генома *Salmonella typhimurium* / Ю. И. Тяпша [и др.] // Экология и животный мир. – 2018. – № 2. – С. 56–62.
12. Тяпша, Ю. И. Молекулярно-генетическая детекция генома штамма *Salmonella dublin* и его биохимические свойства / Ю. И. Тяпша [и др.] // Экология и животный мир. – 2019. – № 2. – С. 18–25.