

Серия «Экономика и экологический менеджмент». – 2014. – № 2. – С. 47–55.

16. Системы менеджмента безопасности пищевых продуктов. Требования к организациям участвующим в пищевой цепи: СТБ 22000-2006. – Введ. 16.10.2006. – Минск: Белорус. Гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2006. – 29 с.

17. Системы менеджмента безопасности пищевых продуктов. Управление безопасностью пищевых продуктов на основе анализа опасностей и критических контрольных точек. Общие требования: СТБ 1470-2012. – Введ. 18.01.2012. – Минск: Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2012. – 11 с.

18. Сурак, Джон Г. Рецепт безопасной пищевой продукции: ИСО 22000 и ХАССП / Джон Г. Сурак // Стандарты и качество. – 2008. – № 2. – С. 96–100.

19. Сурков, И.В. Разработка интегрированной системы менеджмента качества и безопасности на примере кондитерского предприятия / И.В. Сурков, Г.А. Гореликова, В.С. Биндюк // Техника и технология пищевых производств. – 2015. – № 1. – С. 112–117.

20. Толстова, Е.Г. Система ХАССП как методологическая основа обеспечения безопасности продуктов питания / Е.Г. Толстова // Вестник БГАУ. – 2014. – № 1. – С. 130–133.

21. Фролова, Н.Н. Внедрение стандарта ИСО 22000 / Н.Н. Фролова, Н.Н. Храброва // Молочная промышленность. – 2008. – № 7. – С. 9–10.

22. Шепелева, Е.В. Методика оценки рисков безопасности молочной продукции / Е.В. Шепелева, Е.В. Митасева, А.С. Ремизова // Молочная промышленность. – 2011. – № 12. – С. 14–17.

23. Шепелева, Е.В. Принципы ХАССП: международные стандарты в области управления безопасностью пищевой продукции / Е.В. Шепелева // Молочная промышленность. – 2012. – № 9. – С. 62–64.

УДК 619:579.842.14

Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук
Дубаневич О.В., старший научный сотрудник
Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук
Стрельчenea И.И., кандидат ветеринарных наук

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

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ГЕНОМА *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM*

Резюме

Проведен скрининг нуклеотидных последовательностей гена *fliC* к сальмонеллам различных видов, циркулирующих у свиней, пушных зверей, птиц и КРС, и подобраны специфичные праймеры к *Salmonella typhimurium*. В результате подбора оптимальных концентраций реакционных смесей и параметров амплификации сконструирована тест-система ПЦР для детекции генома *Salmonella typhimurium*. Она обладает специфичностью, отсутствием неспецифических шмеров, чувствительностью не менее 20 копий геномов ДНК в исследуемом образце.

Summary

The screening of the nucleotide sequences of the *fliC* gene to salmonella of various species circulating in pigs, fur animals, birds and cattle was carried out and specific primers for *Salmonella typhimurium* were selected. As a result of selection of optimal concentrations of reaction mixtures and filtration parameters, a PCR test system was designed to detect the genome of *Salmonella typhimurium*. It has specificity, the absence of nonspecific Schmer, sensitivity of at least 20 copies of DNA genomes in the sample.

Поступила в редакцию 24.10.2018 г.

ВВЕДЕНИЕ

Сальмонеллез (*Salmonellosis*) – поли-этиологическая инфекционная болезнь с

фекально-оральным механизмом передачи, вызываемая бактериями рода *Salmonella* семейства *Enterobacteriaceae*, характеризу-

ется разнообразными клиническими проявлениями: от бессимптомного носительства до тяжелых септических форм.

При остром течении болезнь у животных проявляется поражением желудочно-кишечного тракта и септициемией, а при подостром и хроническом течении – в виде пневмоний и артритов. У овец, кобыл и реже у коров сальмонеллез сопровождается абортами. У птиц, по мнению Gast (1997), можно выделить три клинические формы сальмонеллеза: пуллороз, тифоидная лихорадка домашней птицы и паратифоидная инфекция [1].

Источниками возбудителя служат больные и переболевшие животные бактерионосители, включая грызунов и диких птиц. Фактором передачи возбудителя инфекции являются инфицированные корма, вода и предметы ухода за животными. У птиц возможна трансовариальная передача сальмонелл.

Сальмонеллез наносит значительный ущерб животноводству, который складывается из падежа значительной части заболевшего молодняка, отставания в росте и развитии переболевших животных, аборт и расходов, связанных с организацией профилактических и лечебных мероприятий. [2].

У человека сальмонеллез проявляется в виде пищевых токсикоинфекций. Наиболее важным резервуаром сальмонелл, представляющим опасность для инфицирования людей, является домашняя птица.

Диагноз устанавливают на основании комплекса клинических, патологоанатомических, эпизоотологических данных и результатов лабораторной диагностики. Широко используемый бактериологический метод выявления сальмонелл путем посева исследуемого материала на среду Эндо или посева через среду накопления с последующей идентификацией в реакциях агглютинации с родовыми и групповыми агглютинирующими сыворотками характеризуется значительной продолжительностью исследования, большой трудоемкостью и высокой себестоимостью. Проведение стандартной процедуры бактериологической идентификации микроорганизмов рода *Salmo-*

nella занимает 3–4 дня.

Рост заболеваемости сальмонеллезом животных и людей обуславливает необходимость разработки современных высокочувствительных и специфичных методов экспресс-диагностики болезни, выявления бактерионосителей, мониторинга кормов для животных, а также первичного животного продукта, полуфабрикатов и готового продукта животного происхождения.

Всем вышеперечисленным требованиям наиболее полно отвечает метод выявления ДНК возбудителя, основанный на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР). С помощью ПЦР удастся обнаружить крайне малое количество сальмонелл, идентифицировать их на видовом и серогрупповом уровнях и подтвердить принадлежность какого-либо штамма определенному серовару сальмонелл [3, 4]. Разработана отечественная тест-система для детекции генома возбудителя *Salmonella cholerae suis* [5].

Актуальность проблемы сальмонеллезов связана с высокими уровнями заболеваемости и сохраняющейся тенденцией к ее росту, трудностями в эпидемиологическом расследовании причин сальмонеллезов, формированием резистентности к противомикробным препаратам, отсутствием эффективной специфической профилактики. Разработка методов экспресс-диагностики сальмонеллезов и методов типирования сальмонелл является одним из важных моментов сдерживания распространения возбудителей сальмонеллезов [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе были использованы следующие материалы: штаммы сальмонелл из коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», набор для выделения нуклеиновых кислот, 10x PCR буфер для Taq ДНК-полимеразы, Taq ДНК полимеразы (5 ед/мкл, Fermentas); смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (25 мМ, Fermentas),

маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» (Fermentas, Литва); 10x TE-буфер (pH 8,0, Fermentas); бромистый этидий (SIGMA, США); агароза (helicon, Россия); раствор MgCl₂ (50 мМ); праймеры (Праймтех), буфер для нанесения проб; стерильная деионизированная вода.

В работе было использовано следующее оборудование: ламинар, микротермостат «BIOSAN-CH100» (Латвия), амплификатор «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США), Gel Doc XR, BIO-RAD (США), микроцентрифуга высокоскоростная (14000 об/мин, Jouan (Франция), комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария) вместимостью 0,1–2 мкл, 0,5–10 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, пробирки типа «эппендорф» вместимостью 0,5 и 1,5 мл, вортекс «BIOSAN» (Латвия), пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл для прибора «С 1000 Thermal Cycler», система для электрофореза «Consort» (Бельгия), термостат SEL LAB (Германия), весы RADWAG AS 220/X (Польша), система подготовки чистой воды «Crystal B», ADRONA (Латвия), паровой автоклав, ионметр (рН-метр).

Методы исследований: Поиск новых синтетических олигонуклеотидных праймеров осуществляли по базам данных GeneBank – Национального института здоровья США, EMBL – Европейской молекулярно-биологической лаборатории. Полученные последовательности нескольких пар праймеров дополнительно тестировали на специфичность с помощью моделирования ПЦР в программе Primer-3 и BLAST on-line (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast). Окончательный выбор праймеров основывался на следующих критериях: высокий индекс сходства фрагмента ДНК различных штаммов *Salmonella typhimurium*, температура отжига 55–60 °С, размер амплифицируемого фрагмента 200–250 пар нуклеотидов (п.н.). В результате выбраны и синтезированы олигонуклеотидные праймеры размером 236 пар нуклеотидов. Ориентировочные температуры плавления и отжига праймеров рассчитывали по формуле $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

Выделение ДНК проводили по прото-

колу к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» фирмы Интерлабсервис.

Анализ бактериальных штаммов сальмонелл на наличие ДНК *Salmonella typhimurium* проводили методом ПЦР с электрофоретической детекцией. В основе метода лежит амплификация специфического участка гена, за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров, содержащих последовательности, комплементарные с целевым участком) и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента Taq-полимеразы. В результате проведения определенного (N) количества циклов амплификации концентрация синтезируемого фрагмента в исследуемой пробе увеличивается в 2N раз (например, в миллион раз после 20 циклов), что позволяет учитывать результаты анализа в 1,5–2 % агарозном геле с визуализацией фрагментов ДНК, окрашенных бромистым этидием в УФ-свете. Для постановки ПЦР использовали: магний в концентрациях 2 и 3 ммоль, ДНК-полимеразу в концентрациях 1,25 и 2,5 единиц активности на 25 мкл реакционной смеси, смесь дНТП в концентрациях 0,2 и 0,4 ммоль, праймеры в концентрациях 0,3 и 0,4 мкмоль. Амплификацию проводили по программе: 1 цикл (95 °С 5 мин), 40 циклов (95 °С 0,5 мин, 54–59 °С 0,5 мин, 72 °С 0,5 мин), 1 цикл (72 °С 5 мин).

Амплификаты (по 5–10 мкл от пробы) анализировали с помощью электрофореза в 1,5–2 % агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При разработке тест-системы ПЦР для обнаружения ДНК *Salmonella typhimurium* использовали базы данных национального центра биотехнологической информации – GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Европейского института биоинформатики – EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>) и Японского банка ДНК – DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>). Используя данные баз, подобрали специфичные праймеры к *fliC* гену *Salmonella typhimurium* (таблица 1).

Таблица 1. – Основные параметры сконструированных праймеров

Праймер	Последовательность, 5'–3'	Температура плавления (T _m), °C	GC, %	Ампликон, п.н.
F-Stm	CGAAATACACTGCAGATGACG	62	47.6	122
R-Stm	ACCTTCGGCTTTACTTGCAG	60	50	

Ориентировочные температуры плавления праймеров рассчитывали по формуле ($T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$).

На рисунке 1 представлено филогенетическое дерево штаммов *Salmonella typhi-*

murium, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella abortusequi*, *Salmonella enteritidis* к гену *fliC*, построенное с помощью программы Align X.



Рисунок 1. – Молекулярно-филогенетическое дерево штаммов *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella abortusequi*, *Salmonella enteritidis* к гену *fliC*

На рисунке 1 видно, что ген *fliC* у данных штаммов сальмонелл имеет достаточно сильную вариабельность по отношению к гену *fliC* *Salmonella typhimurium*.

Специфичность праймеров установи-

ли путем нуклеотидного выравнивания прямого (рисунок 2) и обратного (рисунок 3) праймеров к фрагментам геномов различных штаммов сальмонелл.


```

DQ095553. . . (980) . GAAGCAAAATATGCTGTTAAGGGCG
DQ095554. . . (980) . GAAGCAAAATATGCTGTTAAGGGCG
DQ095560. . . (980) . GAAGTAAACAAATGCTGTTAAGGGCG
EF113939. . . (293) . ATATCTA-CACGATATTATGGCA
EF113940. . . (300) . ATATCTA-CACGATATTATGGCA
AY649742. . . (1069) . GAAGCAAAATATGCTGTTAAGGGCG
DQ838278. . . (969) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
AF159459. . . (1154) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
HQ871174. . . (986) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
HQ871184. . . (986) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
HQ871191. . . (986) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
GU327820. . . (1058) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
GU327821. . . (1058) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
GU327822. . . (1058) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
GU327823. . . (1058) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
GU327824. . . (1058) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
GU327825. . . (1058) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
GU327832. . . (1058) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
GU327833. . . (1058) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
GU327834. . . (1058) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
GU327835. . . (1058) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
AY649740. . . (1058) . CTAGCTA-CGTTGACGCTACCACTG
DQ095491. . . (954) . CGAAATA-CACTGCAGATGAC---G
DQ095492. . . (954) . CGAAATA-CACTGCAGATGAC---G
HM920247. . . (1043) . CGAAATA-CACTGCAGATGAC---G
AY649718. . . (1043) . CGAAATA-CACTGCAGATGAC---G
AY649719. . . (1043) . CGAAATA-CACTGCAGATGAC---G
AY649720. . . (1043) . CGAAATA-CACTGCAGATGAC---G

```

Рисунок 2. – Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей прямого праймера

```

DQ095553. . . (1086) . TTATTGATAAAACAGCTTCT
DQ095554. . . (1086) . TTATTGATAAAACAGCTTCT
DQ095560. . . (1086) . TTATTGATAAAACAGCTTCT
EF113939. . . (404) . AACCCATCAAGGCCA----A
EF113940. . . (411) . AACCCATCAAGGCCA----A
AY649742. . . (1175) . TTATTGATAAAACAGCTTCT
DQ838259. . . (1074) . ATGCCAGCAAAGCCGCTGGG
DQ838278. . . (1074) . ATGCCAGCAAAGCCGCTGGG
AF159459. . . (1259) . ATGCCAGCAAAGCCGCTGGG
HQ871174. . . (1091) . ATGCCAGCAAAGCCGCTGGG
HQ871184. . . (1091) . ATGCCAGCAAAGCCGCTGGG
HQ871191. . . (1091) . ATGCCAGCAAAGCCGCTGGG
GU327820. . . (1163) . ATGCCAGCAAAGCCGCTGGG
GU327832. . . (1163) . ATGCCAGCAAAGCCGCTGGG
GU327833. . . (1163) . ATGCCAGCAAAGCCGCTGGG
GU327834. . . (1163) . ATGCCAGCAAAGCCGCTGGG
GU327835. . . (1163) . ATGCCAGCAAAGCCGCTGGG
AY649740. . . (1163) . ATGCCAGCAAAGCCGCTGGG
DQ095491. . . (1056) . CTGCAAGTAAAGCCGAAGGT
DQ095492. . . (1056) . CTGCAAGTAAAGCCGAAGGT
HM920247. . . (1145) . CTGCAAGTAAAGCCGAAGGT
AY649718. . . (1145) . CTGCAAGTAAAGCCGAAGGT
AY649719. . . (1145) . CTGCAAGTAAAGCCGAAGGT
AY649720. . . (1145) . CTGCAAGTAAAGCCGAAGGT

```

Рисунок 3. – Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей обратного праймера

На рисунке 3 нуклеотидное различие с *Salmonella choleraesuis* составляет 6 нуклеотидов, что является достаточным критерием специфичности праймера.

Отработан режим амплификации при детекции генома *Salmonella typhimurium*, определена чувствительность тест-системы. Изначально в составе реакционной смеси количество полимеразы составило 2,5 единицы, магния – 3 ммоль и дНТП – 0,4 ммоль (рисунок 4).

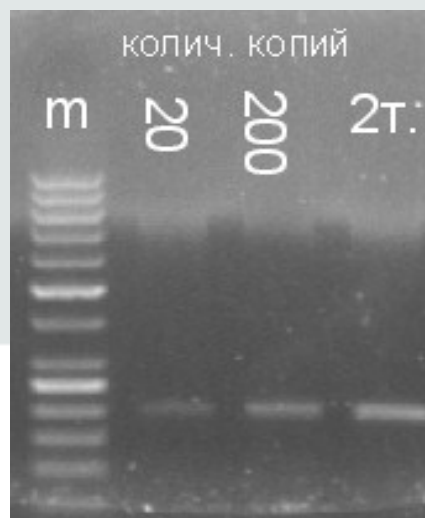


Рисунок 4. – Электрофорез ампликонов полученных при выделении ДНК из разведений культуры *Salmonella typhimurium*

На рисунке 4 видно, что чувствительность тест-системы составляет не менее 20 клеток в исследуемой пробе.

В пробах от 200 клеток до 20 клеток были получены специфические полосы, но с диффузным неспецифическим шлейфом, что могло быть связано с избытком полимеразы (2,5 единицы), магния (3 ммоль) и дНТП (0,4 ммоль).

С пробой, где чувствительность составила 20 клеток, определили оптимальную температуру отжига (рисунок 5).

На рисунке видно, что амплификация успешно происходит в широких диапазонах температур. Наибольшее количество ПЦР продукта образовывалось при температуре отжига 55 °С.

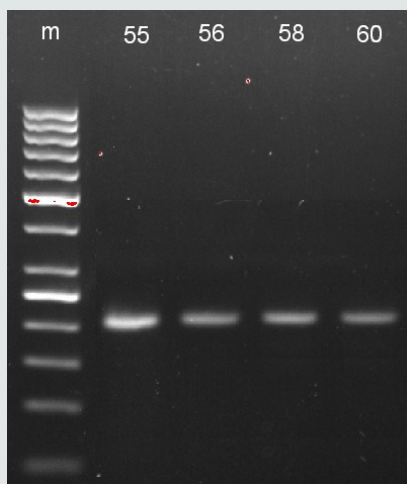


Рисунок 5. – Влияние температуры отжига на количество ПЦР продукта при амплификации

На следующем этапе была определена чувствительность тест-системы с оптимизированными параметрами амплификации и концентрации реагентов: количество полимеразы 1,25 единицы, магния 2 ммоль и дНТП 0,2 ммоль в реакционной смеси (рисунок 6).

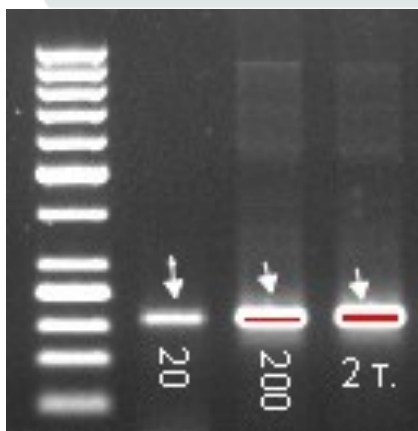


Рисунок 6. – Электрофорез ампликонов, полученных при выделении ДНК из разведений *Salmonella typhimurium*

Чувствительность тест-системы составила не менее 20 клеток сальмонелл в исследуемой пробе. Оптимизированные концентрации в реакционной смеси полимеразы, дНТП и магния привели к исчезновению неспецифических полос.

Родовую и видовую специфичность экспериментальной тест-системы для детекции генома *Salmonella typhimurium* про-

верили с ДНК культур *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *E. coli* (рисунок 7).

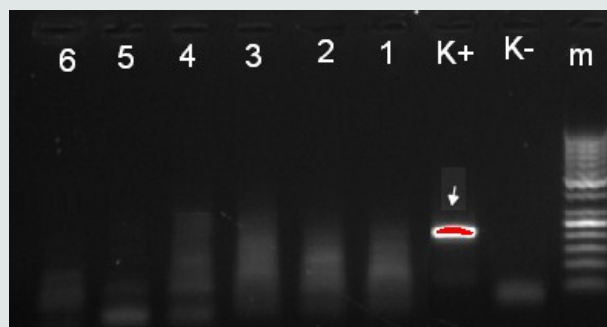


Рисунок 7. – Результаты амплификации с ДНК культур *Salmonella choleraesuis* (1), *Salmonella dublin*(2), *Pasteurella multocida* (3), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (4), *Haemophilus parasuis*(5), *E. coli* (6)

По результатам амплификации с ДНК культур *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *E. coli* видно, что тест система специфична.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Сделан скрининг нуклеотидных последовательностей гена *fliC* сальмонелл различных видов, циркулирующих у свиней, пушных зверей, птиц и КРС, и подобраны специфичные праймеры к *Salmonella typhimurium*, из которых при испытаниях в лабораторных условиях отобрана лучшая пара.

2. Сконструирована отечественная тест-система ПЦР для детекции генома возбудителя *Salmonella typhimurium*.

3. Тест-система ПЦР для детекции генома *Salmonella typhimurium* обладает специфичностью, отсутствием неспецифических шмеров, чувствительностью не менее 20 копий клеток в исследуемом образце.

4. Оптимальные концентрации реагентов реакционной смеси для детекции генома *Salmonella typhimurium*: полимеразы – 1,25 единицы; магний – 2 ммоль; дНТП – 0,2 ммоль.

5. Оптимальный температурный режим амплификации: 1 цикл (95 °С – 5 мин);

40 циклов (95 °С – 0,5 мин, 55 °С – 0,5 мин, 72 °С – 0,5 мин); 1 цикл (72 °С – 5 мин).

ЛИТЕРАТУРА

1. Gast, R.K. Detecting infections of chickens with recent *Salmonella pullorum* isolates using standard serological methods // *Poult Sci.* 1997. – Vol. 76. – P. 17–23.
2. Ахмедов, А.М. Сальмонеллезы молодняка / А.М. Ахмедов. – М.: Колос, 1983. – 256 с.
3. Яцышина, С.Б. Выявление и титрование возбудителей сальмонеллеза молекулярно-генетическими методами: дис. ... канд. биол. Наук / С.Б. Яцышина. – М., 2003. – 112 с.
4. Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR *Food Microbiology*. / J.R. Patel [et al.]. – 2006. – Vol. 23. – P. 39–46.
5. Тяпша, Ю.И. Молекулярно-генетическая детекция генома *Salmonella cholerae* suis / Ю.И. Тяпша, О.В. Дубаневич, А.С. Андрусевич // *Ученые записки УО ВГАВМ. – Витебск*, 2018. – Т. 54, вып. 2. – С. 67–72.
6. Токарев, В.А. Варианты мониторинга госпитальных штаммов ВБИ, сальмонеллезной этиологии / В.А. Токарев, Е.И. Гудкова, А.А. Адарченко // *Внутрибольничные инфекции – проблемы эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики: тез. докл. 2 Рос. науч.-практ. конф. с междунар. участием.* – М., 1999. – С. 236–237.

Наши услуги

- Гематологическое исследование крови
- Биохимическое исследование сыворотки крови
- Бактериальное исследование патологического материала
- Бактериальное исследование молока с подтитровкой к антибиотикам
- Исследование крови реагирующих на туберкулин коров
- Бактериальное исследование содержимого матки и влагалища (слизи, экссудата) с подтитровкой к антибиотикам
- Исследование патологического материала на туберкулез
- Исследование на паразитозы животных (стронгилодоз, трихостронгилодозы, эймериозы, балантидиоз)
- Паразитологические исследования для выявления криптоспоридий, анаплазм, бабезий, балантидий, чесоточных клещей
- Диагностика криптоспоридиоза
- Гельминтологические исследования животных (фасциолез, диктиокаулез, телязиоз, желудочно-кишечные нематодозы)
- Лабораторная диагностика возбудителей инфекции крупного рогатого скота и свиней методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
- Обследование биотопов на выявление промежуточных хозяев трематод и исследование их на партиниты фасциол

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»
220003, г. Минск, ул. Брикета, 28, тел./факс (+37517) 508-81-31
По вопросам приобретения Вы можете обратиться в отдел снабжения и сбыта, тел. (017) 508-81-35
E-mail: bievmtut.by

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»
220003, г. Минск, ул. Брикета, 28, тел./факс (+37517) 508-81-31

По вопросам приобретения Вы можете обратиться в отдел снабжения и сбыта, тел. (017) 508-81-35
E-mail: bievmtut.by