

ВЫЯВЛЕНИЕ ЭПИЗООТИЧЕСКИ ЗНАЧИМОГО СЕРОТИПА САЛЬМОНЕЛЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ (ИРА)

¹Ю.С. Хоменко, научный сотрудник

¹Е.В. Нефедова, кандидат ветеринарных наук

²О.С. Козлова, старший преподаватель

²А.В. Афонюшкин, студент

^{1,2,3}В.Н. Афонюшкин, кандидат биологических наук

¹Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН

²Новосибирский государственный аграрный университет

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины

E-mail: fill555@mail.ru

Ключевые слова: сальмонелла, антиген, реакция агглютинации, бройлеры.

Реферат. В РФ недопустимо наличие в продукции сальмонелл всех серотипов. Однако существующие ИФА-тесты применимы для серомониторинга на наличие антител лишь к сальмонеллам нескольких серотипов. Поэтому нами была предложена система на основе реакции агглютинации с флуоресцентно-меченым антигеном – ИРА. Цель исследования – продемонстрировать использование ИРА на примере анализа эпизоотической ситуации на одной из птицефабрик России и показать пример интерпретации результатов серологических исследований для контроля бактериальных инфекций у цыплят-бройлеров. Особенность новой модификации состоит в том, что в ультрафиолетовых лучах отрицательная реакция «пуговка» светится в виде точки. Мы изучили сыворотку от стада цыплят-бройлеров, неблагополучного по сальмонеллезу, и выявили антитела к сальмонеллам двух серотипов – *Infantis* и *Hamburg*. Анализ серопревалентности к этим двум серотипам сальмонелл позволил оценить большую эпизоотическую значимость для сальмонелл серотипа *Hamburg*. Использование ИРА, в т.ч. на основе антигенов из культур бактерий, выделенных из продукции птицеводства, патологического материала, позволяет осуществлять серологическую диагностику бактериальных инфекций птиц в отношении всего разнообразия бактерий, которые могут встречаться на птицефабрике, в отличие от ИФА-систем.

IDENTIFICATION OF EPIDEMICALLY-SIGNIFICANT SALMONELLA SEROTYPE USING IMMUNOFLUORESCENCE AGGLUTINATION REACTION (IRA)

¹Y.S. Khomenko, Researcher

¹E.V. Nefedova, Ph.D. in Veterinary Sciences

²O.S. Kozlova, Senior Lecturer

²A.V. Afonyushkin, Student

^{1,2,3}V.N. Afonyushkin, Ph.D. in Biological Sciences

¹Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies

²Novosibirsk State Agrarian University

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Keywords: salmonella, antigen, agglutination reaction, broilers.

Abstract. In the Russian Federation, the presence of all serotypes of *Salmonella* in products is unacceptable. However, the existing ELISA tests are applicable for seromonitoring for the presence of antibodies only to *Salmonella* of several serotypes. In the article, the authors proposed a system based on the agglutination

reaction with a fluorescently labeled antigen - IRA. The purpose of the study is to demonstrate the use of IRA in the example of an analysis of the epizootic situation at one of the poultry farms in Russia and to show an example of the interpretation of the results of serological studies to control bacterial infections in broiler chickens. The peculiarity of the new modification is that in ultraviolet rays the negative reaction of the "button" glows in the form of a dot. The authors studied sera from a herd of broiler chickens affected by Salmonellosis and found antibodies to Salmonella of two serotypes, Infantis and Hamburg. The analysis of seroprevalence to these two Salmonella serotypes made it possible to assess the greater epizootic significance for Hamburg serotype Salmonella. The use of the IRA, incl. based on antigens from bacterial cultures isolated from poultry products, and pathological material, allows for serological diagnosis of bacterial infections of birds concerning the entire variety of bacteria that can be found in a poultry farm, unlike ELISA systems.

Сальмонеллез – болезнь больших городов. С ростом урбанизации растет и заболеваемость населения. Есть мнение, что именно продукция яичного птицеводства является причиной этой проблемы. Большие объемы производства продуктов питания плюс длительные сроки хранения – и сальмонелла накапливается, например, в майонезе. В РФ недопустимо наличие в продукции сальмонелл всех 2500 серотипов. Однако никому в голову не придет создавать 2500 тест-систем для каждого серотипа [1]. Не так давно проблема решалась достаточно просто – любая микробиологическая лаборатория могла изготовить антиген из любой выделенной культуры микроорганизмов и провести реакцию агглютинации с сыворотками крови переболевших или привитых животных. Смещение акцента на ИФА-диагностику инфекционных заболеваний имеет свои негативные стороны, заключающиеся в сужении спектра контролируемых инфекций.

Реакция агглютинации основана на реакции склеивания специфичных антигенов, выпадающих в осадок [2]. Такая реакция проводится в пробирках и требует много антигена, сыворотки, крови и времени. К тому же не всегда понятно, прошла ли реакция.

Нами была предложена система на основе реакции агглютинации с флуоресцентно-меченым антигеном. Реакция проходит в лунках 96-луночного микропланшета с V-образным дном. Если реакция положительная, склеивающиеся антигены формируют образование типа «зонтик». Если реакция отрицательная и антигены не склеились, то они скатываются на дно, формируя образование типа «пуговка». Особенность новой модификации состоит в том, что в ультрафиолетовых лучах «пуговка» светится в виде точки. Таким образом, мы можем узнать, к какому заболеванию специфичны антитела, взятые у переболевших животных, и поставить диагноз [3].

Цель исследования – продемонстрировать использование ИРА на примере анализа эпизоотической ситуации на одной из птицефабрик России и показать пример интерпретации результатов серологических исследований для контроля бактериальных инфекций у цыплят-бройлеров.

Антиген получали из взвеси бактериальных клеток, предварительно убитых кипячением. Использовали инактивированные культуры сальмонелл серотипов *Hamburg*, *Enteritidis*, *Reading*, *Typhimurium*, *Virchow*, *Infantis*, а также культуру сальмонеллы, которая была выделена из пищевой продукции. Для получения флуоресцентно-меченых антигенов к взвеси инактивированных бактериальных клеток добавляли 0,1 %-й раствор флуоресцентного красителя – акридиновый оранжевый.

Для определения оптимальной концентрации антиген разводили шагом 1 : 2 и вносили в лунки 96-луночного микропланшета с V-образным дном, через 16 ч инкубации оценивали светимость антигенов с помощью трансиллюминатора GelDok BioRad. Затем проводили реакцию агглютинации с сыворотками крови, которые раститровали с шагом 1 : 2.

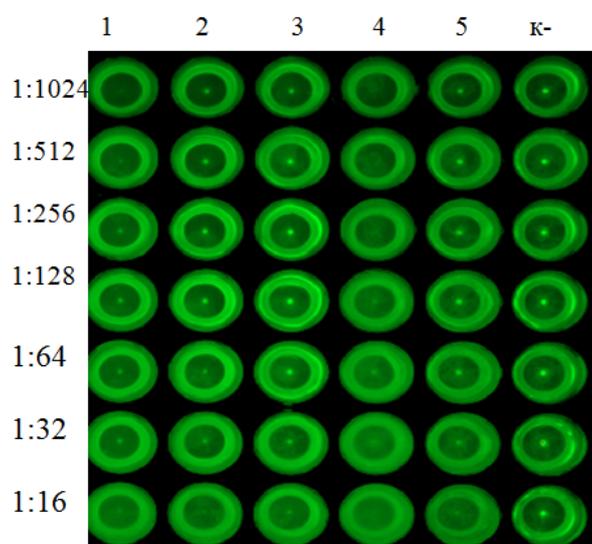
Для оценки серопозитивности птицы исследовали 24 пробы сыворотки крови от цыплят-бройлеров в возрасте 40 дней в ИРА с антигеном сальмонеллы, выделенной ранее на

этой же птицефабрике. Часть положительных образцов были протестированы в РА с флуоресцентно-мечеными антигенами *Hamburg*, *Enteritidis*, *Reading*, *Typhimurium*, *Virchow*, *Infantis* для выявления перекрестных реакций с полевым штаммом.

Преимущество ИРА перед традиционной пробирочной РА состоит в возможности приборного учета и более точной дифференциации серологических реакций типа «пуговка» и «зонтик». V-образные лунки обеспечивают формирование зонтика только при большом количестве высокоаффинных антител, что в целом снижает чувствительность реакции, но повышает ее специфичность. Реакцию ставили с использованием стандартного дозирующего оборудования для ИФА-лабораторий, что также повышало производительность труда в сравнении с классическим, пробирочным методом РА с бактериальными антигенами (рис. 1).

Рис. 1. Пример РА с флуоресцентно-меченым антигеном из культуры 245 *Salmonella infantis*

Fig. 1. Example of AR (agglutination reaction) with fluorescently labeled antigen from a 245 culture of *Salmonella infantis*



Примечание. Положительной считается реакция типа «зонтик», отрицательной – «пуговка», образцы 3 и к- не содержат антител к антигену, образцы 1, 2, 4 содержат антитела в титрах от 1 : 16 до > 1 : 1024.

Note. The reaction of the “umbrella” type is considered positive, and the “button” type is considered negative samples three and k- do not contain antibodies to the antigen, and samples 1, 2, and 4 contain antibodies in titers from 1:16 to > 1:1024.

Из рисунка видно, что реакция прошла с большей частью серотипов в низких титрах 1 : 4 – 1 : 16, и мы можем считать эти значения фоновыми. В исследованных образцах выявлена одна проба к *S. infantis* в титре >1 : 512 (рис. 2).

Рис. 2. Средний титр в РА с антигенами сальмонелл разных серотипов, Log₂
Fig. 2. The average titer in AR with *Salmonella* antigens of different serotypes, Log₂

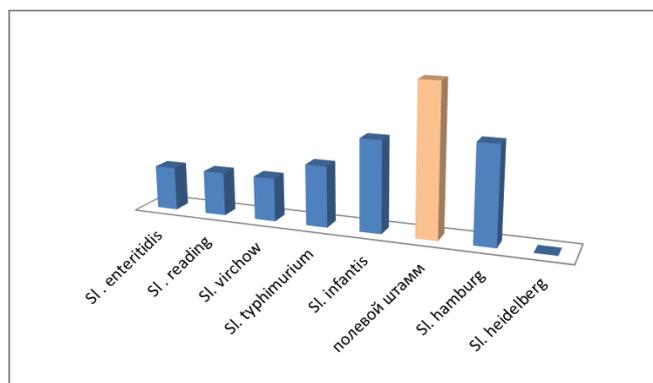
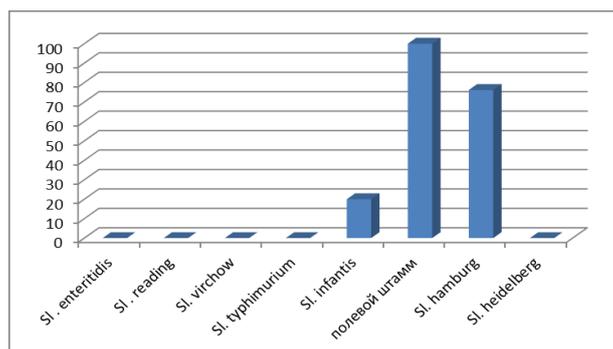


Рис. 3. Доля серопозитивной птицы в РА к антигенам сальмонелл разных серотипов
Fig. 3. The proportion of seropositive poultry in AR to *Salmonella* antigens of different serotypes



Отсутствие перекрестного иммунитета к сальмонеллам серотипов *Virchow*, *Reading*, *Typhimurium*, *Enteritidis* позволяет не считать эти серотипы в качестве эпизоотически значимых для обследуемой птицефабрики [3].

Наличие одной пробы, содержащей антитела к сальмонеллам серотипа *Infantis*, позволяет исключить этот серотип в качестве основного инфекционного агента, но заставляет проводить мониторинг и далее в отношении сальмонелл данного серотипа, контролируя их распространенность в стадах и возможных источниках заноса инфекционного агента (корма, племенная птица и т.д.).

Выявлено 76 % серопозитивной птицы с антигеном серотипа *Hamburg*, и это дает основание считать, что и полевой штамм обладает аналогичной антигенной структурой (рис. 3).

Отсутствие на рынке ИФА систем, позволяющих детектировать антитела к экзотическим серотипам сальмонелл, делает перспективным разработку и применение подобных методов серологической диагностики. На примере данной работы была показана возможность изготовления антигена из недавно выделенного полевого штамма сальмонеллы и, в комплексе с уже разработанными тестами на сальмонелл, проведения сравнительной оценки уровня серопревалентности птицы в отношении сальмонелл разных серотипов. Важнейшим вопросом в ветеринарной микробиологии был и остается вопрос о выявлении эпизоотически значимых штаммов микроорганизмов, ассоциируемых с проблемами, наблюдаемыми в хозяйствах [5]. В качестве одного из критериев эпизоотической значимости следует рассматривать серопревалентность (удельную долю птицы с наличием антител к возбудителю). Ограничение применения антибиотиков, особенно кормовых, резко сужает возможности ветеринарной службы бороться с сальмонеллоносительством неспецифическими методами [6]. Выбор методов специфической профилактики (аутогенные вакцины и бактериофаги) [7] требует точного выявления наиболее актуальных в эпизоотическом и эпидемическом плане штаммов, ликвидация которых позволит радикально снизить контаминацию санитарно значимыми микроорганизмами пищевой продукции.

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы.

1. Серологические исследования птицы на одной из неблагополучных по сальмонеллезу птицефабрик позволили установить циркуляцию сальмонелл двух серотипов – *Infantis*, *Hamburg*.

2. Использование иммунофлуоресцентной реакции агглютинации (ИРА) показало большую эпизоотическую значимость сальмонелл серотипа *Hamburg* в сравнении с сальмонеллами серотипа *Infantis* ввиду более высокой серопревалентности цыплят-бройлеров в возрасте 40 дней (до 76 %).

3. Использование ИРА, в т.ч. на основе антигенов из культур бактерий, выделенных из продукции птицеводства, патологического материала, позволяет осуществлять серологическую диагностику бактериальных инфекций птиц в отношении всего разнообразия бактерий, которые могут встречаться на птицефабрике, в отличие от ИФА-систем.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ и НСО № 22-26-20118 «Изучение возможных механизмов формирования протективного иммунного ответа в отношении некоторых инфекционных агентов свиней и кур при пероральном введении штамма-продуцента антигенов на основе микроорганизмов рода *Bacillus*».

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Foley S.L., Lynne A.M. Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance // *Journal of Animal Science*. – 2008. – N 86 (14). – P.173–187.
2. Молекулярно-биологические методы контроля сальмонеллезов: метод. рекомендации / В.Н. Афонюшкин, Т.В. Сподырева, Ю.Г. Юшков, В.Ю. Коптев. – Новосибирск, 2011. – 63 с.
3. Современные методы контроля сальмонеллёза / В.Н. Афонюшкин, Е.В. Дударева, Л.И. Малахеева [и др.] // *Птицеводство*. – 2008. – № 9. – С. 43–44.
4. Антагонистическая активность лактобактерий из кишечника сельскохозяйственной птицы в отношении клинических изолятов *Salmonella enterica* / В.Н. Афонюшкин, И.Н. Троменшлегер, М.Л. Филипенко [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2016. – № 6. – С. 757–760.
5. Афонюшкин В.Н., Хоменко Ю.С., Фролова О.А. Анализ системы планирования противосальмонеллезных мероприятий на птицефабриках // *Птица и птицепродукты*. – 2019. – № 3. – С. 20–23.
6. Афонюшкин В.Н., Давыдова Н.В., Троменшлегер И.Н. Зависимость уровня инфицированности сальмонеллами в популяции кур от антагонистической активности *Lactobacillaceae* и *Enterococcaceae* в отношении *Salmonella enterica* // *Вестник НГАУ*. – 2020. – №1 (54). – С. 48–55.
7. Афонюшкин В.Н., Дударева Е.В., Черепушкина В.С. Перспективы использования бактериофагов в качестве альтернативы антибиотиков // *Ветеринария*. – 2017. – № 7. – С. 14–17.

REFERENCES

1. Foley S.L., Lynne A.M., Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance, *Journal of Animal Science*, 2008, No. 86 (14), P.173–187.
2. Afonyushkin V.N., Spodyreva T.V., Yushkov Yu.G., Koptev V.Yu., *Molecular biological methods for the control of salmonellosis* (Molecular biological methods of salmonellosis control), Novosibirsk, 2011, 63 p.
3. Afonyushkin V.N., Dudareva E.V., Malaheeva L.I. [et al.], *Pticevodstvo*, 2008, No. 9, pp. 43–44. (In Russ.)
4. Afonyushkin V.N., Tromenshleger I.N., Filipenko M.L. [et al.], *Byulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny*, 2016, No. 6, pp. 757–760. (In Russ.)
5. Afonyushkin V.N., Khomenko Yu.S., Frolova O.A., *Ptica i pticeprodukty*, 2019, No. 3, pp. 20–23. (In Russ.)
6. Afonyushkin V.N., Davydova N.V., Tromenschleger I.N., *Vestnik NGAU*, 2020, No.1 (54), pp. 48–55. (In Russ.)
7. Afonyushkin V.N., Dudareva E.V., Cherepushkin V.S., *Veterinariya*, 2017, No. 7, pp. 14–17. (In Russ.)