



Изучение эпизоотической значимости *Salmonella enterica* серотипа *Hamburg* на птицеводческих предприятиях с использованием серологических исследований

Юлия Сергеевна Хоменко¹, Ольга Сергеевна Козлова², Артем Васильевич Афонюшкин², Василий Николаевич Афонюшкин^{1,2,3}

¹ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий РАН, п. Краснообск; ²Новосибирский государственный аграрный университет; ³ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

Аннотация: В РФ недопустимо наличие в продукции сальмонелл всех серотипов. Однако, существующие ИФА-тесты применимы для серомониторинга на наличие антител лишь для нескольких серотипов сальмонелл. 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 бройлеров, неблагополучного по сальмонеллезу, и выявили антитела к сальмонеллам двух серотипов, *S. infantis* и *S. hamburg*. Анализ серопревалентности к этим двум серотипам сальмонелл позволил установить большую эпизоотическую значимость серотипа *hamburg*. Использование ИРА, в т.ч. на основе антигенов из культур бактерий, выделенных из продукции птицеводства и патологического материала, позволяет осуществлять серологическую диагностику бактериальных инфекций птиц в отношении всего разнообразия бактерий, которые могут встречаться на птицефабрике, в отличие от ИФА-систем.

Ключевые слова: сальмонеллы, антиген, иммунофлуоресцентная реакция агглютинации, бройлеры.

Для цитирования: Хоменко, Ю.С. Изучение эпизоотической значимости *Salmonella enterica* серотипа *Hamburg* на птицеводческих предприятиях с использованием серологических исследований / Ю.С. Хоменко, О.С. Козлова, А.В. Афонюшкин, В.Н. Афонюшкин // Птицеводство. – 2022. – №12. – С. 92-95.
doi: 10.33845/0033-3239-2022-71-12-92-95

Введение. 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 известных серотипов; однако никому в голову не придет создавать 2500 тест-систем для каждого серотипа [1]. Нигде в мире, кроме РФ, это не нуж-

но. Не так давно похожая 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» специфических антигенов, выпадающих в осадок [2]. Такая реакция прово-

дится 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 (ИРА). 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 пюговка 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 по сальмонеллезу на одной из птицефабрик России и показать пример интерпретации результатов серологических исследований для контроля бактериальных инфекций у цыплят-бройлеров.

Материал и методика исследований. 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% раствор флуоресцентного красителя акридиновый оранжевый.

Для определения оптимальной концентрации антигена разводили антигены с 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 процента серопозитивной 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 анти-

генами перечисленных выше серотипов для выявления перекрестных реакций с полевым штаммом.

Результаты исследований и их обсуждение. Преимущество ИРА перед традиционной пробирочной РА состоит в возможности приборного учета и более точной дифференциации серологических реакций типа «пюговка» и «зонтик». V-образные лунки обеспечивают формирование «зонтика» только при большом количестве высокоафинных 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). 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).

Отсутствие перекрестного иммунитета к сальмонеллам серотипов *Virchow*, *Riding*, *Typhimurium*, *Enteritidis* позволяет исключить 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 их заноса (корма, племенная птица и т.д.).

Выявлено 76% серопозитивной птицы с антигеном серотипа *Гамбург*, что дает основание считать, что и полевой штамм обладает

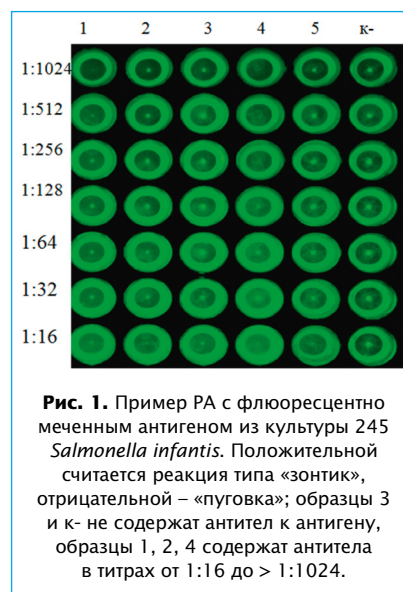


Рис. 1. Пример РА с флуоресцентно меченым антигеном из культуры 245 *Salmonella infantis*. Положительной считается реакция типа «зонтик», отрицательной – «пюговка»; образцы 3 и k- не содержат антител к антигену, образцы 1, 2, 4 содержат антитела в титрах от 1:16 до >1:1024.

аналогичной антигенной структурой (рис. 3).

Отсутствие на рынке ИФА систем, позволяющих детектировать антитела к экзотическим серотипам сальмонелл, делают перспективными 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 сальмонеллы, проведение 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 по борьбе с сальмонеллоносительством неспецифическими методами [6].





Рис. 2. Средний титр в РА с антигенами сальмонелл разных серотипов, log₂

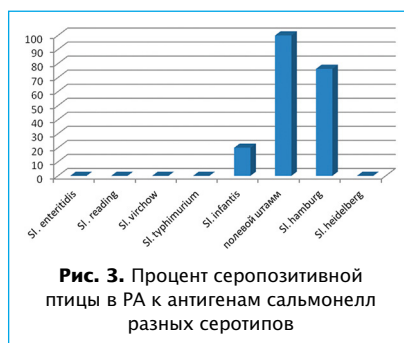


Рис. 3. Процент серопозитивной птицы в РА к антигенам сальмонелл разных серотипов

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.

Выводы. 1. Серологические исследования птицы на одной

из неблагополучных по сальмонеллезу птицефабрик позволили установить циркуляцию сальмонелл двух серотипов, infantis и hamburg.

2. Использование 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 и 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 РНФ 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*».

Литература

1. Foley, S.L. Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance / S.L. Foley, A.M. Lynne // J. Anim. Sci. - 2008. - V. 86. - No 14 (Suppl). - P. E173-E187.
2. Молекулярно-биологические методы контроля сальмонеллез: метод. рекомендации / В.Н. Афонюшкин, Т.В. Сподырева, Ю.Г. Юшков, В.Ю. Коптев. - Новосибирск, 2011. - 63 с.
3. Афонюшкин, В. Современные методы контроля сальмонеллеза / В. Афонюшкин, Е. Дударева, Л. Малахеева, О. Фролова, О. Шкред, М. Филипенко // Птицеводство. - 2008. - №9. - С. 43-44.
4. Афонюшкин, В.Н. Антагонистическая активность лактобактерий из кишечника сельскохозяйственной птицы в отношении клинических изолятов *Salmonella enterica* / В.Н. Афонюшкин, И.Н. Троменшлегер, М.Л. Филипенко, Е.А. Храпов, Е.В. Дударева // Бюл. экспер. биол. и мед. - 2016. - Т. 161. - №6. - С. 757-760.
5. Афонюшкин, В.Н. Анализ системы планирования противосальмонеллезных мероприятий на птицефабриках / В.Н. Афонюшкин, Ю.С. Хоменко, О.А. Фролова, Ю.Н. Козлова, Н.А. Сигарева // Птица и птицепродукты. - 2019. - №3. - С. 20-23.
6. Афонюшкин, В.Н. Зависимость уровня инфицированности сальмонеллами в популяциях кур от антагонистической активности *Lactobacillaceae* и *Enterococcaceae* в отношении *Salmonella enterica* / В.Н. Афонюшкин, Н.В. Давыдова, И.Н. Троменшлегер, О.В. Мишукова, Ю.Н. Козлова, В.С. Черепушкина, Т.Е. Миронова, И.Ю. Клемешова // Вестник Новосиб. ГАУ. - 2020. - №1. - С. 48-55.
7. Афонюшкин, В.Н. Перспективы использования бактериофагов в качестве альтернативы антибиотиков / В.Н. Афонюшкин, Е.В. Дударева, В.С. Черепушкина, М.Л. Филипенко, Ю.Н. Козлова, С.М. Березин // Ветеринария. - 2017. - №7. - С. 14-17.

Сведения об авторах:

Хоменко Ю.С.: младший научный сотрудник; ariskina91@mail.ru. **Козлова О.С.:** старший преподаватель; loi-2005@yandex.ru. **Афонюшкин А.В.:** студент; artemka3451@gmail.com. **Афонюшкин В.Н.:** кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, зав. сектором молекулярной биологии; lisocim@mail.ru.

Статья поступила в редакцию 02.10.2022; одобрена после рецензирования 28.10.2022; принята к публикации 15.11.2022.

Investigation of Epizootic Significance of *Salmonella enterica* serovar. *Hamburg* on Poultry Farms Using Serological Assay

Yulia S. Khomenko¹, Olga S. Kozlova², Artem V. Afonyushkin², Vasily N. Afonyushkin^{1,2,3}

¹Siberian Federal Scientific Centre of AgroBioTechnologies of RAS, Krasnoobsk; ²Novosibirsk State Agrarian University; ³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Branch of RAS, Novosibirsk

Abstract. In Russian Federation the presence of all serotypes of *Salmonella* in food-grade products is unacceptable. However, the existing ELISA tests are applicable for seromonitoring for the presence of antibodies only to several *Salmonella* serotypes. Therefore, we proposed a system based on the agglutination reaction with a fluorescently labeled antigen (IFAT). The purpose of the study was to demonstrate the use of IFAT on the example of an analysis of the epizootic situation at a single Russia poultry farm and to show an example of the interpretation of the results of serological studies to control bacterial infections in broilers. The peculiarity of the new modification of the analysis is that in ultraviolet rays the negative reaction ("button") glows in the form of a dot. We studied the serum from a broiler flock affected by salmonellosis and detected antibodies to *Salmonellas* of two serotypes, *infantis* and *hamburg*. The analysis of seroprevalence of chicks to these two *Salmonella* serotypes made it possible to assign the greater epizootic significance to *hamburg* serotype. The use of IFAT including tests based on antigens from bacterial cultures isolated from poultry products and pathological material allows for serological diagnosis of bacterial infections in poultry in relation to the entire variety of bacteria that can be found in a poultry farm, unlike ELISA systems.

Keywords: *Salmonellas*, antigen, immunofluorescent agglutination test (IFAT), broilers.

For Citation: Khomenko Y.S., Kozlova O.S., Afonyushkin A.V., Afonyushkin V.N. (2022) Investigation of epizootic significance of *Salmonella enterica* serovar. *Hamburg* on poultry farms using serological assay. *Ptitsevodstvo*, 71(12): 92-95. (in Russ.)

doi: 10.33845/0033-3239-2022-71-12-92-95

References

1. Foley SL, Lynne AM (2008) *J. Anim. Sci.*, **86**(14 Suppl):E173-87; doi 10.2527/jas.2007-0447.
2. Afonyushkin VN, Spodyreva TV, Yushkov YG, Koptev VY (2011) Molecular Biological Methods of Control of Salmonellosis. Novosibirsk, 63 pp. (in Russ.).
3. Afonyushkin V, Dudareva E, Malakheeva L, Frolova O, Shkred O, Filipenko M (2008) Modern methods of control of salmonellosis. *Ptitsevodstvo*, (9):43-4 (in Russ.).
4. Afonyushkin VN, Tromenshleger IN, Filipenko ML, Khrapov EA, Dudareva EV (2016) Antagonistic activity of intestinal lactobacteria from domestic fowl against clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **161**(6):757-60 (in Russ.).
5. Afonyushkin VN, Khomenko YS, Frolova OA, Kozlova YN, Sigareva NA (2019) *Poult. Chicken Prod.*, (3):20-3; doi 10.30975/2073-4999-2019-21-3-20-23 (in Russ.).
6. Afonyushkin VN, Davydova NV, Tromenshleger IN, Mishukova OV, Kozlova YN, Cherepushkina VS, Mironova TE, Klemeshova IY (2020) *Proc. Novosibirsk State Agrar. Univ.*, (1):48-55; doi 10.31677/2072-6724-2020-54-1-48-55 (in Russ.).
7. Afonyushkin VN, Dudareva EV, Cherepushkina VS, Filipenko ML, Kozlova YN, Berezin SM (2017) Prospects for using bacteriophages as an alternative to antibiotics. *Veterinary*, (7):14-7 (in Russ.).

Authors:

Khomenko Y.S.: Junior Research Officer; ariskina91@mail.ru. **Kozlova O.S.:** Senior Lecturer; loi-2005@yandex.ru. **Afonyushkin A.V.:** Student; artemka3451@gmail.com. **Afonyushkin V.N.:** Cand. of Biol. Sci., Lead Research Officer, Head of Sector of Molecular Biology; lisocim@mail.ru.

Submitted 02.10.2022; revised 28.10.2022; accepted 15.11.2022.

