



УДК 619:616.98-076:579.842.14:637.072:636.521.58

П.О. ШУТЧЕНКО, канд. вет. наук, ст. наук. співробітник

Б.Т. СТЕГНІЙ, академік НААН України

А.П. GERILOVICH, докт. вет. наук, ст. наук. співробітник

Р.Г. КАЗАНЦЕВ, мол. наук. співробітник

ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків

## МЕТОД ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЇ ГІБРИДИЗАЦІЇ *IN SITU* В СИСТЕМІ ІНДИКАЦІЇ САЛЬМОНЕЛ У ПРОДУКТАХ ПТАХІВНИЦТВА

*Адаптовано метод флуоресцентної гібридизації in situ у загальну систему індикації збудника сальмонельозу. Визначено особливості динаміки змін кількості генетичного матеріалу S. typhimurium у м'язовому шлунку, м'язовій тканині, печінці, серці курчат за гострого експериментального сальмонельозу. Отримано нові дані щодо циркуляції S. typhimurium у хворій на сальмонельоз птиці.*

На основі аналізу й експериментального порівняння ефективності існуючих модифікацій молекулярно-біологічних методів, які є технологічно новими й універсальними щодо різних груп емерджентних бактеріальних патогенів, здійснюються підбір і адаптація методу флуоресцентної гібридизації *in situ* [3]. Метод включає використання специфічних ДНК-зондів для виявлення кодованих ознак патогенності або видоспецифічної послідовності рибосомальної ДНК бактерій роду *Salmonella* з подальшою хемілюмінесцентною детекцією продуктів гібридизації нуклеїнових кислот [1]. Адаптована методика флуоресцентної гібридизації *in situ* на основі спеціальних вимог спрямована на гармонізацію їх із традиційними і загальноприйнятими схемами контролю в харчовій мікробіології, зокрема для контролю бактеріальної забрудненості продукції птахівництва збудником сальмонельозу (*S. typhimurium*) [2]. Інтеграція нового методу молекулярної біології в діючу систему мікробіологічного контролю дозволить підвищити ефективність проведених досліджень, швидкість діагностичного алгоритму, точність встановлення діагнозу, забезпечить порівнянність і достовірність результатів випробувань [4].

**Мета роботи** – визначити динаміку зміни відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* методом флюо-

ресцентної гібридизації *in situ* у субпродуктах (м'язовий шлунок, печінка, серце) та м'язах (біла та червона м'язова тканина) курчат, експериментально інфікованих сальмонельозом.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для досліджень слугували зразки органів, отримані від птиці, евтаназованої на 5-ту, 10-ту й 15-ту добу після зараження внутрішньо (перша група) та внутрішньом'язово (друга група) добовою культурою *S. typhimurium*. Для виготовлення гістологічних препаратів зразки м'язової тканини, м'язового шлунка, серця, печінки, в яких імовірно локалізується збудник сальмонельозу, розміром не більше (1×1×1) см, попередньо фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну. Зразки тканини зневоднювали шляхом витримки в розчинах етилового спирту зростаючої концентрації (70, 80, 96%). Зневоднені шматочки тканини заливали у парафін. Із парафінових блоків виготовляли серійні зрізи, їх депарафінізували й обробляли гібридизаційним зондом, міченим FITC.

Гістопрепарати аналізували із застосуванням флуоресцентного мікроскопа «Nicon» (Японія) з довжиною хвилі світлофільтра 494 нм/520 нм, а потому переглядали їх під імерсійною системою мікроскопа. Візуалізація сигналів на гістопрепаратах базувалася на деталізації

не менше трьох полів зору. Для дослідження використовували гомологічні за структурою ділянки гістопрепарату-мішені та контролю. Одержані результати обробляли на персональному комп'ютері за допомогою світлового мікроскопа «Axioskop 40» (Carl Zeiss, Німеччина) з цифровою фотокамерою «ProgRes C 3» (Jenoptic, Німеччина). Статистичний аналіз одержаних результатів досліджень обробляли за допомогою програми «MS Office Excel 2010». Для морфометричного аналізу використовували програму «Відео Тест – Морфологія 5,1». Динаміку відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* відображали у формі гістограм.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні гістозрізів м'язового шлунка (рис. 1) курчат 1-ї та 2-ї дослідних груп встановлено вірогідну тенденцію до зниження рівня відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* упродовж усього періоду спостережень. Так, при аналізі кривої динаміки зміни відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* у курчат обох дослідних груп було встановлено майже однакову динаміку. Проте показники у курчат 2-ї групи були дещо вищими, ніж у курчат 1-ї. Так, у курчат 1-ї дослідної групи, показники відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* знижувалися з (0,35±0,028)% на 5-ту добу до (0,225±0,047)% на 15-ту. У курчат 2-ї дослідної групи показники також вірогідно зменшувалися з (0,425±0,025)% на 5-ту добу до (0,275±0,025)% – наприкінці строку спостереження на 15-ту добу. Розбіжність між показниками

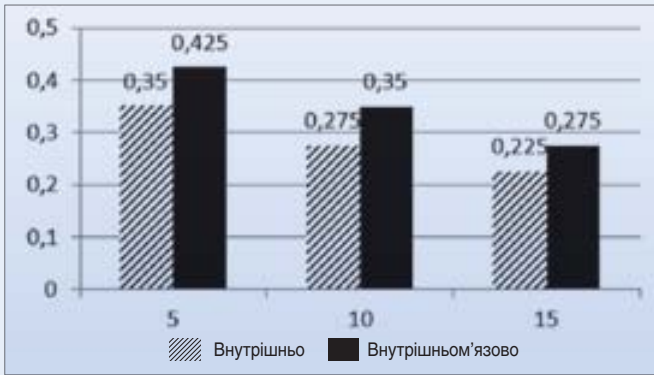


Рис. 1. Динаміка відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* у м'язовому шлунку курчат

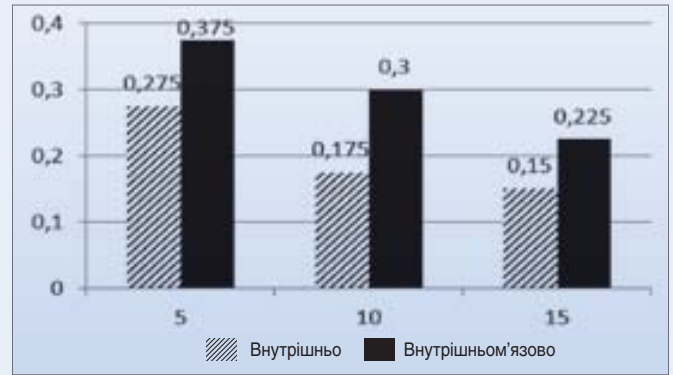


Рис. 2. Динаміка відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* у м'язовій тканині курчат

1-ї та 2-ї груп була незначною й не перевищувала 0,1 %.

Цей факт пов'язаний із поступовою елімінацією бактеріальних клітин до повної реконвалесценції.

При дослідженні гістозрізів м'язової тканини (рис. 2) курчат 1-ї та 2-ї дослідних груп встановлено тенденцію до поступового зниження відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* упродовж усього періоду спостережень. Звертав на себе увагу той факт, що в курчат обох дослідних груп динаміка змін кількості генетичного матеріалу набувала майже однакового характеру. Проте показники курчат 2-ї групи були дещо вищими, ніж 1-ї. Так, у курчат 1-ї дослідної групи показники відсоткової кількості знаходилися на рівні  $(0,275 \pm 0,025) \%$  на 5-ту добу і знижувалися впродовж усього періоду спостережень до  $(0,15 \pm 0,028) \%$  на 15-ту добу. У курчат 2-ї дослідної групи відсоткова кількість генетичного матеріалу *S. typhimurium* починала зменшуватися вже з початку спостережень на 5-ту добу –  $(0,375 \pm 0,025) \%$ . Процес зниження тривав до 15-ї доби, коли

цей показник досягав найменшого значення –  $(0,225 \pm 0,047) \%$ . Розбіжність між показниками 1-ї та 2-ї груп на 10-ту добу спостережень перевищувала 0,1 %.

Така динаміка свідчить про поступове виведення клітин сальмонели з організму інфікованих курчат.

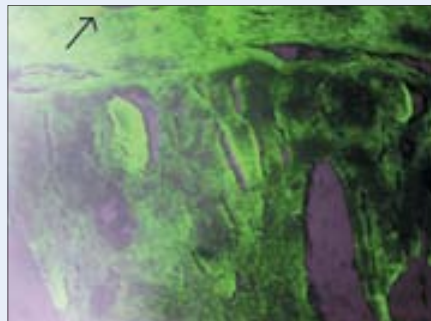


Рис. 3. Фрагмент м'язової тканини курчати, інфікованого *S. typhimurium* на 10-ту добу внутрішньом'язово. FITC,  $\times 200$ . Стрілкою позначено локалізацію *S. typhimurium*

При візуальному аналізі гістопрепаратів виявляли поступове зменшення відсоткової кількості колоній *S. typhimurium* у тканинах курчати, інфікованого збудником сальмонельозу внутрішньом'язово (рис. 3).

При проведенні мікроскопічних досліджень гістозрізів печінки (рис. 4) курчат обох дослідних груп встановлено тенденцію до поступового зниження показників відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* упродовж усього періоду спостережень. Показники у курчат 2-ї групи були вищими, ніж у 1-ї. Так, у курчат 1-ї дослідної групи показник відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium*, який на 5-ту добу знаходився на рівні  $(0,275 \pm 0,025) \%$ , знизився до  $(0,125 \pm 0,025) \%$  на 15-ту добу. У курчат 2-ї дослідної групи динаміка поступового зниження кількості генетичного матеріалу відрізнялася несуттєво протягом перших п'яти діб. Так, на 5-ту добу цей показник знаходився на рівні  $(0,375 \pm 0,025) \%$ , а на 15-ту –  $(0,225 \pm 0,047) \%$ . Але вже на 10-ту добу показники в групах відрізнялися майже вдвічі –  $(0,152 \pm 0,047) \%$  у 1-ї групі та  $(0,3 \pm 0,04) \%$  у 2-ї.

Така динаміка, на наш погляд, може бути пов'язана із внутрішньом'язовим шляхом зараження в експерименті, який є нетиповим, і значною кількістю КУО *S. typhimurium*.

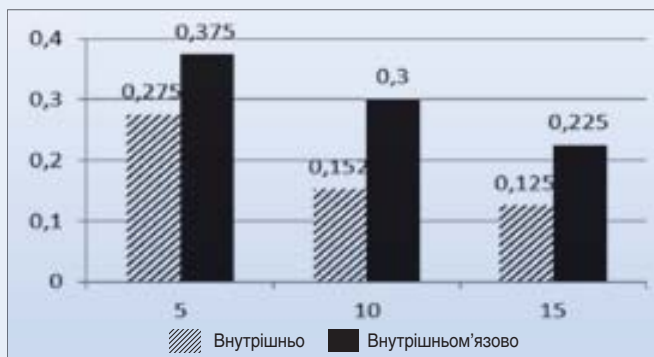


Рис. 4. Динаміка відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* у печінці курчат

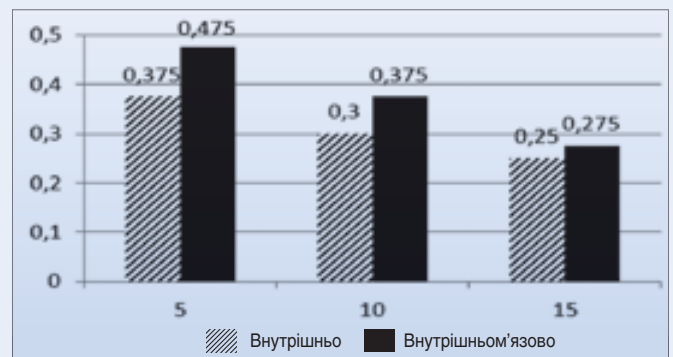
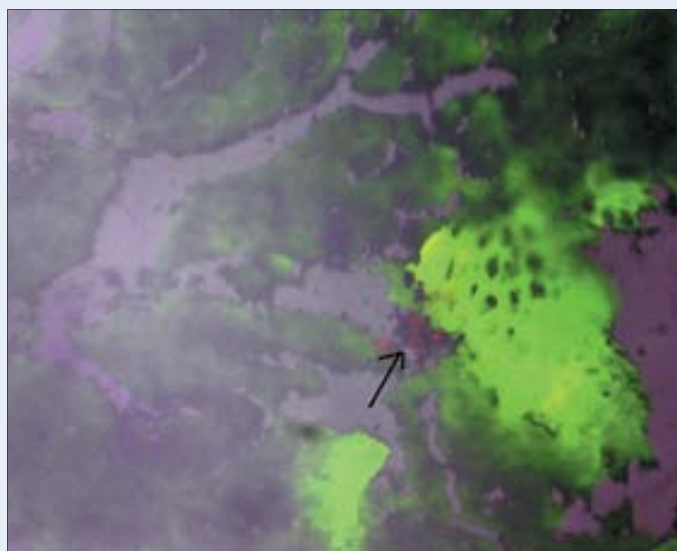
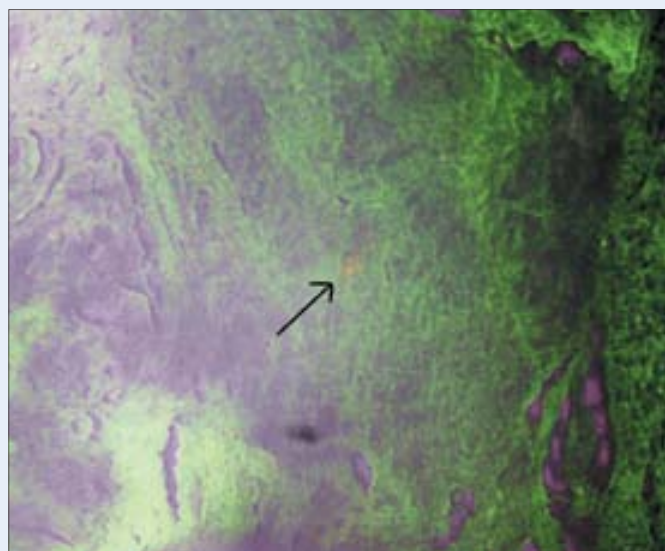


Рис. 5. Динаміка відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* у серці курчат



**Рис. 6.** Фрагмент серцевої тканини курчати, інфікованого *S. typhimurium* на 15-ту добу внутрішньом'язово. FITC,  $\times 200$ . Стрілкою позначено локалізацію колоній *S. typhimurium*



**Рис. 7.** Фрагмент серцевої тканини курчати, інфікованого *S. typhimurium* на 15-ту добу перорально. FITC,  $\times 200$ . Стрілкою позначено локалізацію колоній *S. typhimurium*

При дослідженні гістозрізів серця (рис. 5) курчат 1-ї та 2-ї дослідних груп, як і в попередніх випадках, встановлено зниження рівня кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* упродовж усього періоду спостережень. Так, у курчат 1-ї дослідної групи спостерігалось поступове зменшення рівня генетичного матеріалу з  $(0,375 \pm 0,025)\%$  на 5-ту добу до  $(0,25 \pm 0,028)\%$  на 15-ту. У курчат 2-ї дослідної групи цей рівень знизився з  $(0,475 \pm 0,025)\%$  на 5-ту добу до  $(0,275 \pm 0,025)\%$  на 15-ту. Таким чином, показники відносної кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* у курчат обох дослідних груп на 15-ту добу мали майже однаковий характер. Розбіжність між показниками 1-ї та 2-ї груп була незначною і не перевищувала 0,1%.

Можливо, незначну різницю між показниками у курчат обох дослідних груп на 15-ту добу можна пояснити патогенним міокардіотропним впливом сальмонели.

Флуоресцентні сигнали на гістопрепаратах були достатньо інтенсивними та мали чіткі округлі контури (рис. 6, 7).

## ВИСНОВКИ

1. При аналізі динаміки змін відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* в органах курчат після внутрішньом'язового та перорального інфікування штамом *S. typhimurium* (В)

встановлено вірогідну тенденцію до її зменшення у тканинах курчат незалежно від шляху інфікування, що пов'язано з поступовою елімінацією бактеріальних клітин до повної реконвалесценції.

2. Показники відсоткової кількості генетичного матеріалу *S. typhimurium* у серці та м'язовому шлунку курчат обох дослідних груп були майже в 1,5 разу вищими, ніж в інших органах, що, на наш погляд, може бути пояснено органотропністю у патогенезі гострого сальмонельозу.

3. Одержані результати свідчать про ефективність застосування методу флуоресцентної гібридизації *in situ* для індикації генетичного матеріалу *S. typhimurium* у м'ясі та субпродуктах з метою оцінки безпечності та якості продукції птахівництва.

## СПИСОК

### ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Глик Б. Молекулярная биотехнология: принципы и применение [Текст] / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
2. Ефимочкина Н.Р. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа: дис. ... докт. биол. наук / Н.Р. Ефимочкина. – М., 2010. – 349 с.
3. Коничев А.С. Молекулярная биология

[Текст] / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Academia, 2003. – 400 с.

4. Молекулярная клиническая диагностика. Методы [Текст] / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.

Одержано 3.06.2015

**Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* в системе индикации сальмонелл в продуктах птицеводства.** П.О. Шутченко, Б.Т. Стегний, А.П. Герилович, Р.Г. Казанцев

Адаптирован метод флуоресцентной гибридизации *in situ* в общую систему индикации возбудителя сальмонеллёза. Определены особенности динамики изменений количества генетического материала *S. typhimurium* в мышечном желудке, мышечной ткани, печени, сердце цыплят при остром экспериментальном сальмонеллёзе. Получены новые данные относительно циркуляции *S. typhimurium* в инфицированной сальмонеллёзом птице.

**The method of fluorescence *in situ* hybridization in system of salmonella indication in poultry products.** P.O. Shutchenko, B.T. Stegnyy, A.P. Gerilovych, R.G. Kazantsev

The method of fluorescence *in situ* hybridization in general system of salmonella indication was adapted. The dynamics changes features of *S. typhimurium* genetic material amount in the gizzard, muscle, liver, heart during acute experimental salmonellosis was determined. New data about *S. typhimurium* circulation in infected with salmonella fowl was received. ☉