

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

УДК 619:616.34-022-07:636.2-053.2

РОЗРАХУНОК ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ДЛЯ ГЕНОТИПУВАННЯ ОКРЕМИХ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *SALMONELLA*

Ареф'єв В.Л., Герілович А.П.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Сальмонельози тварин і людини у теперішній час залишаються однією з найбільш актуальних проблем як у медичній, так і у ветеринарній практиці. Особливо суттєвою є проблема поширення сальмонел через контаміновану тваринну сировину та продукти харчування.

Також при вивченні проблеми поширення сальмонелозів серед тварин та людей потрібні дослідження щодо типування сальмонел зі встановленням їх серологічного варіанту в тому чи іншому конкретному випадку. Це дасть відповідь про джерело походження збудника інфекції, тому що є сальмонели, які можуть спричиняти захворювання тільки у людини, є такі, що можуть поширюватися від тварин і призводити до захворювання людей.

У результаті аналізу літературних джерел встановлено, що не всі опубліковані олігонуклеотидні послідовності є дійсно специфічними до заявлених сероваріантів сальмонел, що показала їх перевірка в програмі BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [5, 6, 7, 8].

Раніше нами було розроблено методику виявлення сальмонел на основі полімеразної ланцюгової реакції без генотипування за загальнородовими консервативними ділянками генів роду *Salmonella*. Крім того, було розроблено та оптимізовано для практичного використання систему типування таких представників роду *Salmonella*, як *Salmonella Enterica* серотипів *Salmonella Enteritidis* та *Salmonella Typhimurium* [1, 2].

Подальші наші дослідження було спрямовано на створення засобів типування сальмонел методом полімеразної ланцюгової реакції з розширенням кількості сероваріантів для диференціації.

Матеріали та методи досліджень. Розробку праймерних систем здійснювали для наступних серологічних варіантів сальмонел, які мають медичне та ветеринарне значення: *Salmonella Typhi*, *Salmonella Dublin*, *Salmonella Gallinarum*. У нашій роботі, було використано біостатистичні методи дослідження. Для подальшої розробки олігонуклеотидних послідовностей для обраних сальмонел були створені локальні бази нуклеотидних послідовностей, отриманих шляхом їх завантаження з баз даних GenBank.

Аналіз їх щодо консервативності був проведений за допомогою програми BioEdit, після чого в місцях консервативних мотивів з використанням AmplifX 1.5 були розраховані олігонуклеотиди за принципами видової та міжвидової стабільності послідовностей та питомої специфічності до певних серотипів сальмонел.

Серотипоспецифічні праймери перевіряли методами локального та глобального порівнянь за розробленим у ННЦ «ІЕКВМ» алгоритмом [3, 4].

Результати досліджень. По-перше, ми проаналізували геномні карти обраних серотипів сальмонел.

Аналіз баз даних нуклеотидних послідовностей показав, що найбільшою гомогенністю та широтою вибірки секвенованих ділянок характеризувалися наступні гени:

- *viaB* – ген, що мав сероспецифічні мотиви для *Salmonella Typhi*. Відповідно, на його основі була обрана ділянка, що обмежувала фрагмент таргетного гену довжиною 738 п.н.
- *SeD_A1104* – ген, що мав сероспецифічні мотиви для *Salmonella Dublin*. За допомогою біоінформатичних досліджень були виявлені праймери, що фланкували ділянку довжиною 203 п.н.
- *SG0266* – ген, що мав сероспецифічні мотиви для *Salmonella Gallinarum*. Обрана ділянка для ампліфікації, обмежена специфічними праймерами, мала довжину 97 п.н.

Таблиця 1 – Розрахункові олігонуклеотидні послідовності для типування *Salmonella Typhi*, *Salmonella Dublin*, *Salmonella Gallinarum*

| № | Сероваріант сальмонели | Назва праймера | Послідовність 5'-3' | Продукт, п.н. |
|---|------------------------------|----------------|-----------------------|---------------|
| 1 | <i>Salmonella Typhi</i> | Styphi_F | CACGCACCATCATTTCCACCG | 738 |
| | | Styphi_R | AACAGGCTGTAGCGATTAGG | |
| 2 | <i>Salmonella Dublin</i> | Sdub_F | ACGCGAAATCTGATGGTCTT | 203 |
| | | Sdub_R | GCCCACCAGTTGTGAAAGGC | |
| 3 | <i>Salmonella Gallinarum</i> | Sgal_F | CCGCACAACACATCAGAAAG | 97 |
| | | Sgal_R | AGCTGCCAGAGTTACGCTG | |

Висновки. 1. Проаналізовано геномні карти для розрахунку праймерів на *Salmonella Typhi*, *Salmonella Dublin*, *Salmonella Gallinarum*.

2. На основі проведеного аналізу геномів вище перелічених сальмонел розраховані праймери, що отримали назву: *Styphi_F/R* – для *Salmonella Typhi* (738 п.н.), *Sdub_F/R* – для *Salmonella Dublin* (203 п.н.), *Sgal_F/R* – для *Salmonella Gallinarum* (97 п.н.).

Перспективи для подальших досліджень. На основі одержаних розрахунків планується синтезувати праймери та відпрацювати протокол проведення полімеразної ланцюгової реакції з їх використанням у практичних умовах.

Список літератури

1. Герілович, А.П. Розробка олігонуклеотидних систем для виявлення сальмонел у біологічних об'єктах [Текст] / А.П. Герілович, В.Л. Ареф'єв, С.І. Вовк // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2011. – Вип. 95. – С. 47–49.
2. Ареф'єв, В.Л. Разработка методики индикации ДНК сальмонелл и идентификации серологических вариантов *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* на основе полимеразной цепной реакции. [Текст] / В.Л. Ареф'єв // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2012. – Вип. 96. – С. 77–80.
3. Герілович, А.П. Методологія розрахунку та теоретичної перевірки якості олігонуклеотидів для виявлення нуклеїнових кислот патогенів тварин на основі полімеразної ланцюгової реакції [Текст] / А.П. Герілович // Вет. біотехнологія : бюл. / IBM. – К., 2009. – № 14. – С. 56–59.
4. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях [Текст] / А.П. Герілович [та ін.] ; під заг. ред. Б.Т. Стегнія, А.П. Геріловича. – Х., ННЦ «ІЕКВМ». – 258 с.
5. PCR multiplex for detection of *Salmonella Enteritidis*, *Typhi* and *Typhimurium* and occurrence in poultry meat [Text] / Camila Guimaraes de Freitas [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2010. – Vol. 139. – P. 15–22.
6. Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, *Typhimurium*, *Choleraesuis*, *Infantis*, *Hadar*, *Enteritidis*, *Dublin* and *Gallinarum*, by multiplex PCR [Text] / A. Masato [et al.] // J. Microbiol. Meth. – 2011. – Vol. 85 – P. 9–15.
7. Simone Alves Mendes Ribeiro. Molecular differentiation between *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *pullorum* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *gallinarum* [Text] / Simone Alves Mendes Ribeiro // Brazil. J. Microbiol. – 2009. – Vol. 40. – P. 184–188.
8. Multiplex PCR for the concurrent detection and differentiation of *Salmonella* spp., *Salmonella Typhi* and *Salmonella Typhimurium* [Text] / Chai Fung Pui [et al.] // Trop. Med. Health. – 2011. – Vol. 39, № 1. – P. 9–15.

DESIGN OF THE OLIGONUCLEOTIDE SEQUENCES FOR GENOTYPING OF DIFFERENT SPECIES OF SALMONELLA

Arefyev V.L., Gerilovich A.P.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

*The analysis of genomic maps for searching oligonucleotide sequences for *Salmonella Typhi*, *Salmonella Dublin*, *Salmonella Gallinarum* was done. On the base of this study new primers for PCR typing of the above mentioned *Salmonella* species were selected by NSC "IECVM".*

УДК 619.616.98:579.843

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОЛЬОВИХ ІЗОЛЯТІВ І МУЗЕЙНИХ ШТАМІВ КАМПІЛОБАКТЕРІЙ

Бабкін А.Ф., Обуховська О.В., Куценко В.А., Калініченко Т.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Кампілобактеріоз – зоонозна інфекційна хвороба багатьох видів тварин і людей, яка характеризується поліморфністю проявів (враженням статевих органів, тимчасовим безпліддям, абортми, мертвонародженістю, враженням шлунково-кишкового тракту). Збудником хвороби являються бактерії роду *Campylobacter*. За даними на 2012 р. рід *Campylobacter* об'єднує 14 видів. При цьому для сільськогосподарських тварин і людей найбільше етіологічне значення мають види *C. jejuni* та *C. Coli* [1, 2]

За даними ВООЗ, кампілобактеріоз широко розповсюджений у світі та обумовлює до 15 % усіх гострих кишкових інфекцій тварин і людей. Найбільш суттєвими природними резервуарами збудників кампілобактеріозу є свійські, сільськогосподарські тварини та птиця. Захворювання спричиняє значні економічні збитки тваринницьким закладам за рахунок недотримання приплоду та втрати дорослими тваринами своїх репродуктивних якостей.

На сьогоднішній день відсутні вітчизняні засоби діагностики та профілактики кампілобактеріозу тварин. Головною умовою створення ефективних діагностиків і вакцин є наявність стабільних виробничих штамів. Тому актуальним напрямом роботи для вітчизняних фахівців ветеринарної медицини є ізоляція польових культур кампілобактерій та вивчення їх біологічних властивостей з метою визначення перспективних виробничих штамів [4].

Матеріали та методи. Дослідження проводили в лабораторії вивчення бруцельозу ННЦ «ІЕКВМ» упродовж 2011–2012 рр. Усього було досліджено 253 проби патологічного матеріалу від птиці різних вікових груп з 10 птахогосподарств, а також 10 проб патологічного матеріалу від ВРХ з 4 господарств різних областей України. При цьому визначали морфологічні, культуральні, біохімічні та антибіотикорезистентні властивості культур. Для дослідження від птиці відбирали жовчний міхур, печінку, сліпі відрізки кишечнику; від ВРХ – аборт плоди.

Проби патологічного матеріалу та деліюфілізовані культури кампілобактерій висівали на поживні середовища – МПБ, НРА з антибіотиками (цефалотин, фузидін), МПА, середовище Ендо, кампілобакагар, кров'яний кампілобакагар. Висіви культивували в мікроаерофільних умовах (5 % кисню, 10 % CO₂, 85 % азоту) за температури 42 °C та 37 °C упродовж 72 годин. Облік росту здійснювали кожну добу візуально, на 3 добу – шляхом мікроскопії мазків.

За умов виявлення характерного росту у вигляді дрібних, прозорих з сіруватим відтінком колоній на МПА та у вигляді сіро-блакитного кільця на поверхні НРА, здійснювали мікроскопію мазків (фарбування за Грамом та Стемпом). При виявленні в мазках типової для кампілобактерій морфології (Г-, спірально зігнуті, S-подібні палички) проводили подальші висіви на диференційній середовища з метою отримання чистої культури та її типізації.

Супутня мікрофлора, яка була ізольована в процесі досліджень, була типована до виду за стандартними методиками.

Окрім польових ізолятів вивчали властивості музейних культур кампілобактерій, що зберігались у ліофілізованому стані впродовж тривалих строків.

Результати досліджень. У результаті бактеріологічних досліджень патологічного матеріалу від 253 голів птиці із клінічними ознаками типовими для кампілобактеріозу (пригнічений стан, стійка діарея) та від 10 аборт плодів ВРХ нами було ізольовано та вивчено 345 культур мікроорганізмів. Найбільш питому вагу серед них займали *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*.

З метою ізоляції польових культур кампілобактерій досліджували матеріал від птиці та ВРХ з 14 господарств п'яти різних областей України.