DOI <http://dx.doi.org/10.18551/rjoas.2016-02.02>

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ
SALMONELLA ENTERICA ПОДВИДА ARIZONAE**
IMPROVEMENT OF ALLOCATION AND IDENTIFICATION OF SALMONELLA ENTERICA
BACTERIA OF ARIZONAE SUBSPECIES

Ленёв С.В., ведущий научный сотрудник
Lenev S.V., Leading Researcher

Лаишевцев А.И., научный сотрудник
Laishevtcev A.I., Researcher

**Всероссийский государственный центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия**
All-Russian State Research Institute for Control Standardization and Certification of
Veterinary Preparations, Moscow, Russia

Пименов Н.В.*, доктор биологических наук
Pimenov N.V., Doctor of Biological Sciences

**ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии – МВА имени К.И.Скрябина», Москва, Россия**
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State
Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K.I. Skryabin»,
Moscow, Russia

E-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

В период с 2014 по 2015 гг. были проведены морфологические, культуральные, биохимические, генетические и биологические исследования 623 штаммов сальмонелл 270 различных сероваров, находящихся во Всероссийской коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов». В ходе исследований наибольший для нас интерес представили 16 штаммов бактерий рода *Salmonella* подвида *Arizonae*, являющихся музейными. Изучение их биохимических свойств позволило выявить особенности, позволяющие совершенствовать методику индикации и идентификации сальмонелл данной группы.

ABSTRACT

During the period between 2014 and 2015 we performed morphological, cultural, biochemical, genetic and biological studies of 623 salmonella strains of 270 different serovars, included in the Russian state collection of microorganism strains of FSBI «All-Russian State Research Institute for Control Standardization and Certification of Veterinary Preparations». During the investigation 16 museum bacteria strains of *Salmonella* genus, *Arizonae* sp. proved to be of great interest to us. Study of their biochemical properties revealed peculiarities enabling to improve indication and identification technique of the salmonella of this kind.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Штаммы сальмонелл, *Salmonella Arizonae*, биохимическая идентификация, генетическая идентификация.

KEY WORDS

Salmonella strains, *Salmonella Arizonae*, biochemical identification, genetic identification.

Впервые изоляты *Salmonella Arizonae* были получены в 1939 году Mary E. Caldwell и Dwight L. Ryerson сотрудниками отдела бактериологии и зоологии в университете штата Аризона. Источником данного возбудителя стал *Heloderma suspectum* – аризонский ядозуб. В дальнейшем в литературе появляются упоминания о синонимах данного возбудителя *Paracolobactrum arizonae* [1] и *Arizona hinshawii* [2], и лишь в 2002 году он был отнесен к отдельному подвиду. В 9-ом издании схемы Кауфманна-Уайта [3], опубликованной в 2007 году Всемирной организацией здравоохранения, упомянуто о существовании 99 серовариантов данного подвида. Однако, в отличие от сальмонелл других подвидов *Salmonella Enterica*, серовары сальмонелл подвидов *Arizonae* и *Diarizonae* не имеют наименований, а обозначаются по формуле антигенной структуры. Причем вопросы эпизоотического значения серовариантов и их идентификации внутри подвида *Arizonae* изучены недостаточно.

Источником и естественным резервуаром сальмонелл данных сероваров являются рептилии (ящерицы, змеи, черепахи). Необходимо упомянуть о том, что помимо рептилий восприимчивыми к данному возбудителю являются индюшата, поросята, овцы [4], собаки, кошки, обезьяны, козы [5].

В литературных источниках достаточно часто можно встретить описание клинических случаев заболеваний человека, вызванных возбудителем *Salmonella Arizonae* с принципиально различной формой проявления болезни, в том числе и болезней с летальным исходом. Указываются формы проявления заболевания аризонозной этиологии такие как, менингиты [6], в том числе у новорожденных [7], гастроэнтериты у детей с микроцефалией [8], отиты, остеомиелиты [9], плевриты, синуситы, перитониты, бактериемии [10]. Имеется описание случая возникновения септического артрита тазобедренного сустава у 10-тимесячного ребенка [11]. Отмечают также возможность протекания данного заболевания без сопутствующих для сальмонеллезной инфекции гастроэнтеритов [12].

Спорадические вспышки аризоноза среди людей наиболее часто регистрируются в юго-западной части США, где преобладающей частью населения являются латиноамериканцы, среди которых распространено употребление в пищу змеиного мяса, а также применение лекарственных препаратов на основе змеиных субпродуктов [13]. Помимо стран Латинской Америки и США данная проблема охватывает страны Южной Азии и Великобританию [14].

Наиболее восприимчивыми оказываются новорожденные и маленькие дети. Из большого количества клинических случаев можно сделать заключение, что инфекционный процесс усиливается и приобретает острую форму благодаря низкому иммунному статусу. Имеется мнение, что заболевание людей связано с повышенной проницаемостью гематоэнцефалического барьера, врожденными травмами, отсутствием сформированного клеточного иммунитета, а также обусловлено вертикальным заражением от матери. Переболевшие аризонозом пациенты зачастую впоследствии приобретают неврологические осложнения, потерю слуха, гидроцефалию [15] и т.д.

В качестве антибиотикотерапии при сальмонелле аризона-инфекции используются антибиотики широкого спектра действия – ампициллин, гентамицин, фторхинолоны и цефаллоспорины третьего поколения [16].

В животноводстве и птицеводстве проблема аризона-инфекции наиболее актуальна в разведении индеек. Индейководство в нашей стране интенсивно развивается. Рост производства и потребления продукции индейководства требует совершенствования методов ветеринарно-санитарного контроля и ветеринарно-санитарной экспертизы с учетом специфичности продукта и особенностей возбудителя [17]. В соответствии с директивами совета 2009/158/ЕС от 30 ноября 2009 г. по ветеринарно-санитарным условиям, регламентирующим торговлю внутри Сообщества и импорт из третьих стран домашней птицы и инкубационных яиц, инкубационное яйцо индейки в обязательном порядке проходит контроль на наличие возбудителя сальмонеллеза подвида *Arizonae* [18]. Изучение микробиологических свойств и генетических характеристик штаммов сальмонелл подвида *Arizonae* на основе гена

16S rRNA позволит обогатить знания о возбудителе опасной болезни, наносящей ущерба индейководству, и совершенствовать методы бактериологического исследования аризона-инфекции.

Целью настоящих исследований стало изучение свойств штаммов бактерий рода *Salmonella* подвида *Arizonae* с последующим совершенствованием этапов комплексной индикации и идентификации с дифференциацией возбудителя аризона-инфекции, основываясь на рутинных методах микробиологии и методах генетического секвенирования гена 16S rRNA.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом исследования послужили 16 музейных штаммов сальмонелл подвида *Arizonae* из коллекции ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ ВГНКИ) 63-z36; 44-67; 48:k:z53; 48:j:z; 1669/75; 107-36/71; 5992-52; S05; 4601/54; S0-50; 261-58; 3065-61-253; PC-123; Ni-14; 301-57/142; 4041. В качестве тест-культур при идентификации энтеробактерий с применением коммерческих биохимических тест-наборов использовали эталонные культуры *Salmonella enteritidis* 13076 и *Escherichia coli* 25922.

Для исследований были использованы следующие питательные среды: агар Эндо, хромогенная среда для сальмонелл см1007, висмут-сульфитный агар, мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонный бульон (МПБ). Для биохимической идентификации использовались тест-системы Microbact 12e, ЭНТЕРО тест 24 Н, API 20e.

В ходе работы применяли эпизоотологические, бактериологические, серологические, статистические методы исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение культуральных, биохимических, биологических свойств штаммов, а также генетическую идентификацию проводили на базе ФГБУ ВГНКИ.

Для получения первой генерации бактериальной массы сальмонелл лиофилизированные культуры микроорганизмов изучаемых штаммов разводили в 1 мл мясо-пептонного бульона (МПБ) с дальнейшим переносом данного материала в пробирку с этой же средой. Культивировали в термостате при 37 °C в течение 18 часов с последующим пересевом на МПБ для получения второй генерации при культивировании в течение 5 часов. Аналогичные посевы и культивирование в том же режиме проведены со штаммами *Salmonella enteritidis* 13076 ATCC и *Escherichia coli* ATCC 25922, которые в дальнейшем использовали как эталонные культуры. Затем материал пересевали на мясо-пептонный агар (МПА), агар Эндо, хромогенную среду для сальмонелл CM1007, висмут-сульфитный агар для изучения культуральных свойств.

Спустя 24 часов культивирования штаммов *Salmonella Arizonae* на среде МПА наблюдали рост прозрачных колоний в диаметре 1-2 мм «S»-формы. На хромогенной среде спустя сутки культивирования CM1007 11 изучаемых штаммов имели синюю окраску колоний, 5 штаммов – пурпурную окраску. На висмут-сульфитном агаре отмечали рост чёрных колоний с блестящей зоной вокруг них, при этом сама среда приобретала черно-коричневый цвет. На среде Эндо спустя 48 часов культивирования колонии 13 изучаемых штаммов *Salmonella Arizonae* имели металлический блеск и малиновое окрашивание, колонии трёх штаммов оставались прозрачными (рисунок 1).

При этом необходимо обратить внимание на тот факт, что данные подвиды сальмонелл являются медленно ферментирующими, именно поэтому культивирование на среде Эндо должно продолжаться в течение 48 часов. Металлический блеск, полученный при культивировании *S. Arizonae*, характерен для *E. coli*, поэтому при бактериологическом исследовании патологического материала, а также объектов

ветеринарного и санитарно-эпидемиологического надзора необходимо дифференцировать возбудителя от кишечной палочки и иных колиформ. Причем малиновый цвет среды Эндо и металлический блеск колоний в случае роста *S. Arizonae* обусловлен действием фермента β -галактозидазы, поэтому будет проявляться не сразу, а ближе к 48 часам инкубирования [19].

На рисунках 1 и 2 показан рост культур штаммов подвида *S. Arizonae* и *S. Enterica* (серовар *enteritidis*) через 48 часов инкубирования, где очевидны культуральные различия.

Возможности микроорганизмов сбраживать лактозу напрямую зависят от активности β -галактозидазы. Насколько известно для утилизации лактозы микроорганизмы используют 2 фермента. Первый – пермеаза, необходим для переноса молекул лактозы в клетку. Второй – β -галактозидаза, обеспечивает гидролиз поступившей молекулы с образованием глюкозы и галактозы. У истинных лактозоотрицательных микроорганизмов (не ферментирующих лактозу) оба фермента отсутствуют. В то же время встречаются микробные виды, у которых отсутствует только пермеаза, а β -галактозидаза имеется – это так называемые поздно ферментирующие виды. К таким культурам относится *S. Arizonae*. Наличие фермента β -галактозидазы можно выявить в тесте с использованием галактопиранозиды – ONPG, который является бесцветным веществом синтетического происхождения и имеет структурное сходство с лактозой. Фермент β -галактозидаза расщепляет ONPG с образованием глюкозы и орто-нитрофенила – вещества, окрашивающего субстрат в желтый цвет.

Рисунок 1 - Рост колоний штамма *Salmonella Arizonae* 44-67 на среде Эндо при 48 ч. инкубирования

Рисунок 2 - Рост колоний штамма *Salmonella Enterica* серовара *enteritidis* 13076 на среде Эндо при 48 ч. инкубирования (контроль)

Кроме того, при культивировании сальмонеллы аризона на хромогенной среде *sm1007* производства «OXOID» были получены неоднозначные результаты. Одиннадцать штаммов на данной среде имели не типичную для бактерий рода *Salmonella* синюю окраску (рисунки 3, 5), что в свою очередь связано с активностью β -глюкуронидазы.

β -глюкуронидаза (сокр. GUS) – фермент, синтезируемый некоторыми бактериями, который катализирует расщепление всех бета-глюкуронидов. Поскольку у растений активность этого фермента фактически не выявляется, то кодирующий данный фермент бактериальный ген широко используется как репортерный ген в трансгенозе растений. Высокие уровни бактериального фермента β -глюкуронидазы могут приводить к реактивации канцерогенов в кишечнике или распаду желчных кислот.

Методы определения активности GUS основаны на освобождении фенолфталеина, нитро- или аминифенола, а также обладающего флюоресценцией 4-

метил-умбеллиферона из соответствующих синтетических бета-глюкуронидов при действии на них фермента. В результате появления продуктов ферментации индикатор окрашивает колонии микробов и среду вокруг, помогая отличить их от бесцветных (неокрашенных) колоний микроорганизмов, не ферментирующих данный субстрат. Дифференциация при таком подходе осложняется тем, что сахаролитические и протеолитические ферменты микроорганизмов весьма многообразны и универсальны (часто встречаются у представителей разных видов). Это обуславливает относительно невысокие дифференцирующие свойства традиционных сред. Для более четкой дифференциации культур у них желательно определять родо- и видоспецифические ферменты. В конце XX века в бактериологическую практику вошли дифференциальные среды нового поколения – хромогенные, принцип действия которых основан на выявлении высокоспецифичных ферментов у искомым микроорганизмов. К таким ферментам относятся, например, бета-D-глюкуронидаза *Escherichia coli* или бета-D-глюкозидаза энтерококков. Для обнаружения уникального фермента и, соответственно, идентификации микроорганизма, в состав среды вводят хромогенный субстрат – вещество, при расщеплении которого этим ферментом образуются окрашенные или флюоресцирующие продукты. В результате колонии при микробном росте окрашиваются в определенный цвет или приобретают способность к флюоресценции при ультрафиолетовом облучении. Поскольку хромогенный субстрат или их смесь вводятся в состав сред (в том числе селективных) для первичного посева, то результат – выделение чистой культуры и ее идентификация – может быть получен уже в течение первых суток исследования.

На рисунках 3, 4 и 5 показан полученный рост колоний культур с наличием фермента β -глюкуронидаза, идентифицированных в последствии секвенированием как сальмонеллы подвидов *S. Arizonae* и *S. Diarizonae* и культуры *S. enteritidis* (подвид *S. Enterica*), не обладающей данным ферментом.

Рисунок 3 - Рост колоний штамма *Salmonella Arizonae* 44-67, имеющий фермент β -глюкуронидазу

Рисунок 4 - Рост колоний штамма *Salmonella enteritidis* 13076, не имеющий фермент β -глюкуронидазу

Рисунок 5 - Рост колоний штамма *Salmonella Arizonae* 1669/75 (идентифицированный в последующем как *Salmonella Diarizonae*), имеющий фермент β -глюкуронидаза.

Как видно на рисунках 3, 4, 5, при использовании хромогенной питательной среды см1007 нельзя однозначно судить о принадлежности культуры к определенному подвиду. Штаммы, принадлежащие подвиду *Arizonae*, необходимо дифференцировать от иных, имеющих положительную β -глюкуронидазную активность бактерий, в том числе *Salmonella Diarizonae*, *Salmonella Indiana*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Shigella dysenteriae* и т.д.

При изучении у исследуемых штаммов сальмонеллы аризона способности утилизировать малонат отметили, что 15 из них имеют положительный результат в малонатном тесте, в то время как *S. Arizonae* 63-z36 и *S. enteritidis* 13076 – отрицательный.

Биохимическая идентификация. Использование биохимических наборов значительно ускоряет процесс идентификации бактерий. Интересным является тестирование исследуемых штаммов различными наборами для биохимической идентификации микроорганизмов.

В качестве тест-систем для идентификации грамположительных энтеробактерий нами были выбраны ЭНТЕРО тест 24 Н, Microbact 12е, API 20 Е. Постановку реакции проводили в полном соответствии с инструкциями на перечисленные тест-системы.

Таблица 1 - Результаты биохимической и генетической идентификации штаммов *Salmonella* подвида *Arizonae*

п/п		ЭНТЕРО тест 24 Н	Microbact 12е	API 20 Е	Результаты генетической идентификации*
1		2	3	4	5
1	<i>S. Arizonae</i> 63-z36	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Enterica</i>	<i>Salmonella</i> Bongori – 100% Genbank cp006692, fr877557, NR_116124.
2	<i>S. Arizonae</i> 44-67	<i>S. Diarizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Diarizonae</i> – 100%. Genbank – AB273735, NR_044373.
3	<i>S. Arizonae</i> 48:k:z53	<i>S. Diarizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Diarizonae</i> – 100%. Genbank – AB273735, NR_044373.
4	<i>S. Arizonae</i> 48:j:z	<i>S. Diarizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Diarizonae</i> – 100%. Genbank – AB273735, NR_044373.
5	<i>S. Arizonae</i> 1669/75	<i>S. Diarizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Diarizonae</i> – 100%. Genbank – AB273735, NR_044373.
6	<i>S. Arizonae</i> 107-36/71	<i>S. Diarizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Diarizonae</i> – 100%. Genbank – AB273735, NR_044373.
7	<i>S. Arizonae</i> 5992-52	<i>S. Diarizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Diarizonae</i> – 100%. Genbank – AB273735, NR_044373.
8	<i>S. Arizonae</i> S05	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Arizonae</i> – 100%. Genbank – cp006693.1, cp000880.
9	<i>S. Arizonae</i> 4601/54	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Arizonae</i> – 100%. Genbank – cp006693.1, cp000880.
10	<i>S. Arizonae</i> S0-50	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Arizonae</i> – 100%. Genbank – cp006693.1, cp000880.
11	<i>S. Arizonae</i> 261-58	<i>S. Diarizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Diarizonae</i> – 100%. Genbank – AB273735, NR_044373.
12	<i>S. Arizonae</i> 3065-61-253	<i>S. Diarizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Diarizonae</i> – 100%. Genbank – AB273735, NR_044373.
13	<i>S. Arizonae</i> 4041	<i>S. Diarizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Diarizonae</i> – 100%. Genbank – AB273735, NR_044373.
14	<i>S. Arizonae</i> PC-123	<i>S. Diarizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Arizonae</i> – 100%. Genbank – cp006693, cp000880.
15	<i>S. Arizonae</i> Ni-14	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Arizonae</i> – 100%. Genbank – cp006693, cp000880.
16	<i>S. Arizonae</i> 301-57\142	<i>S. Diarizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>S. Arizonae</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Diarizonae</i> – 100%. Genbank – AB273735, NR_044373.
17	<i>S. Enteritidis</i> 13076	<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enterica subsp. <i>Enterica</i> – 100%. Genbank CP007222, CP007534.

* В столбце приведены данные генетической идентификации культуры: наименование вида, подвида, процент гомогенности со штаммами генетического банка, наименование этих штаммов.

Интерпретация биохимических данных о культурах бактерий, полученных при использовании тест-системы ЭНТЕРО тест 24N, осуществлялась при помощи книги кодов ENTEROtest 24 N. Интерпретация полученных биохимических данных, полученных при использовании тест-системы Microbact 12E, осуществлялась при помощи программного обеспечения Microbact 2009. Интерпретация полученных биохимических данных, полученных при использовании тест-системы API 20 Е

проводилась при помощи веб интерфейса Web Api. Результаты идентификации приведены в таблице №1.

Генетическая идентификация. В последующем нами была проведена генетическая идентификация изучаемых бактерий, основываясь на методах, изложенных в «Методических рекомендациях по генетической идентификации бактерий на основе проведения анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК», разработанных Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов». Результаты данных исследований также приведены в таблице 1 для сопоставления с данными биохимической идентификации штаммов *S. Arizonae*.

Резюмируя полученные данные, представленные в таблице 1, выявились интересные аспекты в специфичности диагностических тест-систем, основанных на биохимических свойствах культур бактерий. Так, система ЭНТЕРО тест 24 Н идентифицировала музейный штамм *S. Arizonae* 63-z36 как *S. Enterica* варианта enteritidis, хотя при проведении генетической идентификации установлена принадлежность данного штамма к *Salmonella Bongori*. В то же время при проведении идентификации, используя тест-систему Microbact 12е, был получен результат, свидетельствующий о принадлежности данного штамма к *S. Arizonae*. При помощи системы API 20 E, как и при использовании двух предыдущих систем, достоверно идентифицировать подвид не удалось.

Как видно из данных, представленных в таблице 1 диагностическая специфичность тест-систем для идентификации энтеробактерий различна. Совпадение результатов генетических исследований с результатами биохимической идентификации в 88,24% отмечено при использовании тест-системы ЭНТЕРО тест 24 Н и 35,29% при использовании систем Microbact 12е и API 20 E.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение свойств музейных культур штаммов бактерий рода *Salmonella* подвида *Arizonae* из коллекции ФГУ ВГНКИ позволило расширить представление о микробиологических особенностях данных бактерий и пересмотреть представление об их подвидовой принадлежности. Так, из 16 изученных культур, считавшихся подвидом *Arizonae*, 10 штаммов были идентифицированы как подвид *Diarizonae*, 1 штамм принадлежал к виду *S. Bongori* и только 5 – к подвиду *Arizonae*.

Биохимические свойства для *Salmonella* подвидов *Arizonae*, *Diarizonae* и вида *Salmonella Bongori*, как было выяснено в ходе исследований, являются схожими, за исключением некоторых особенностей.

Возможностью сбраживания малоната обладают подвиды *Salmonella Enterica* subsp. *Arizonae*, *Salmonella Enterica* subsp. *Diarizonae* и *Salmonella Enterica* subsp. *Salamae*. В наших исследованиях возможностью сбраживать малонат обладали 15 штаммов, 5 из которых относятся к подвиду *Arizonae* и 10 – к подвиду *Diarizonae*. *Salmonella Bongori* малонат не сбраживает. Однако, штаммы *S. Arizonae* 63-z36 и *S. enteritidis* 13076 проявили отрицательный малонатный тест. Эти результаты мы связываем с тем, что некоторые бактерии рода *Salmonella* способны использовать малонат в качестве источника углеродов. Одновременная утилизация малоната натрия и сульфата аммония в процессе роста приводит к образованию гидроксида натрия и, тем самым, повышается щелочность среды. В создающейся щелочной среде изменяется цвет реактива от зеленого до синего, что обусловлено присутствием индикатора pH – бромтимоловый синий. Данный тест широко используется для дифференциации энтеробактерий, положительная реакция отмечается у штаммов из родов *Enterobacter*, *Klebsiella* и подвидов *Arizonae* и *Diarizonae* рода *Salmonella*, в то время как другие подвиды данного рода дают отрицательный результат на данный тест.

Следует отметить, что данный тест был разработан E. Leifson в 1933 году для облегчения идентификации кишечной палочки от клебсиеллы. Позднее Shaw в 1956 установил, что серовары подвида *Arizonae* рода сальмонелл являются малонат-положительными, в то время как все остальные подвиды являются малонат-отрицательными [17]. Выявление нами в ходе исследований штамма с отрицательным малонатным тестом обогащает имеющиеся литературные данные.

Положительная β -галактозидазная активность свойственна для бактерий вида *Salmonella Bongori*, *Salmonella Enterica* subsp. *Arizonae* и *Salmonella Enterica* subsp. *Diarizonae*. В нашей ситуации β -галактозидазная активность проявилась у всех 16 штаммов.

Возможность сбраживания лактозы в большей степени свойственна *Salmonella Enterica* subsp. *Diarizonae*, но имеются серовары *Salmonella Enterica* subsp. *Arizonae*, которые также обладают данной способностью. Так, из 16 исследованных штаммов только 5 проявили данное свойство – 3 штамма *Diarizonae* и 2 штамма *Arizonae*.

Положительная β -глюкуронидазная активность отмечается у *Salmonella Enterica* subsp. *Diarizonae* и *Salmonella Enterica* subsp. *Arizonae*, причём у сероваров данных подвидов активность может быть как положительная, так и отрицательная. Среди подвида *Diarizonae* 9 из исследованных штаммов проявили положительную β -глюкуронидазную активность и 1 штамм – отрицательную. Среди подвида *Arizonae* данная активность проявилась у 2 из 5 штаммов. Штамм, относящийся к виду *S. Bongori* имеет отрицательную β -глюкуронидазную активность.

При проведении биохимической идентификации сальмонелл из исследованной группы с использованием трёх коммерческих тест-систем: Microbact 12e, ЭНТЕРО тест 24 Н и API 20 Е, провести точную идентификацию до видовой принадлежности бактерии *S. Bongori* не удалось. Данный аспект важен в практической диагностике, т.к. фактически определяет возможность дифференцировать патогенные варианты сальмонелл от сапрофитных. Наиболее достоверные результаты определения подвида бактерий рода *Salmonella* были получены при использовании системы ЭНТЕРО тест 24 Н, что подтверждено генетическими исследованиями: совпадение результатов генетических исследований с результатами биохимической идентификации отмечено в 88,24% случаев относительно 35,29% при использовании других тест-систем.

Система для биохимической идентификации Microbact 12e оказалась малоэффективна для идентификации бактерий рода *Salmonella* подвида *Diarizonae* и вида *Bongori*. При проведении биохимической идентификации культур *S. Arizonae* с использованием данной диагностической системы во всех случаях был получен положительный достоверный результат. При использовании тест-системы API 20 Е были получены аналогичные результаты, что и при использовании Microbact 12e.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований свойств у 16 музейных штаммов, ранее отнесенных к роду *Salmonella* подвида *Arizonae*, методом секвенирования гена 16s rRNA было определено, что штамм *S. Arizonae* 63-z36 является сапрофитным штаммом относящийся к роду *Salmonella Bongori*, а штаммы *S. Arizonae* 44-67, 48:k:z53, 48:j:z, 1669/75, 107-36/71, 5992-52, 261-58, 3065-61-253, 4041, 301-57\142 в соответствии с результатами генетической идентификации принадлежат к подвиду *Diarizonae*.

Наибольшая результативность и достоверность полученных результатов была получена при проведении секвенирования гена 16 s rRNA. В этом случае гомогенность с базой GenBank во всех случаях была равна 100%.

Бактерии рода *Salmonella* подвида *Arizonae* имеют схожие биохимические свойства с *Salmonella Diarizonae*. Именно поэтому штаммы подвида *Diarizonae* являются основными возбудителями, от которых стоит дифференцировать *Salmonella Arizonae*, основываясь на биохимических свойствах.

При проведении идентификации особое внимание стоит обратить на возможность сбраживать малонат. Данной возможностью обладают *Salmonella* подвида *Diarizonae* и *Salmonella* подвида *Arizonae* в равных соотношениях.

Возможность сбраживать лактозу в большей степени свойственна для *S. Diarizonae*, но имеются серовары *S. Arizonae*, которые также обладают лактозоположительными свойствами. В настоящих исследованиях 3 штамма, идентифицированные как *Arizonae*, являлись лактозоотрицательными и 2 – лактозоположительными.

Вариабельная реакция на активность β -глюкуронидазы является особенностью лишь двух подвигов рода *Salmonella* – *Arizonae* и *Diarizonae*. Среди подвида *Diarizonae* 9 из исследованных штаммов проявили положительную β -глюкуронидазную активность и 1 штамм – отрицательную. Среди подвида *Arizonae* данная активность проявилась у 2 из 5 штаммов.

При использовании коммерческих тест-систем для идентификации изучаемых бактерий по биохимическим свойствам наибольшую эффективность показала система ЭНТЕРО тест 24 Н, которая смогла идентифицировать 88,24% изучаемых образцов. Тест системы API 20 Е и Microbact 12е в равной степени смогли правильно идентифицировать 35,29% исследуемых образцов. Провести видовую идентификацию штамма *S. Bongori* не удалось ни одной из трёх использованных тест-систем. Примененными системами для идентификации энтеробактерий во всех случаях достоверно определить получилось родовую принадлежность бактерий.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Kauffmann, F. 1941. Ueber mehrere neue *Salmonella*-Typen. ActaPathol.Microbiol. Scand. 18:351-366.
2. Ewing, W. H. 1969. *Arizona hinshawii* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 19:1.
3. Antigenic formulae of the salmonella serovars 2007
4. Hall MLM, Rowe B. *Arizona* 26:29:30 in sheep in the United Kingdom. Vet Rec 1980; 107: 581-2.
5. Guckian, J. C., E. H. Byers, and J. E. Perry. 1967. *Arizona* infection of man. Arch. Intern. Med. 119:170-175.
6. *Salmonella enterica* serotype *arizonae*: a rare entity in neonatal meningitis D Juyal, VK Rathaur, N Sharma.
7. <http://www.hindawi.com/journals/cripe/2013/813495/>
8. <http://jcm.asm.org/content/41/12/5830.full?sid=c3009c1d-68ff-4e61-b47e-89cc247fd544>
9. Osteomyelitis due to *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*: the price of exotic pets [http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61342-2/abstract](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61342-2/abstract)
10. Fatal Case of *Salmonella enterica* subsp. *Arizonae* Gastroenteritis in an Infant with Microcephaly <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309002/>
11. *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* bone and joints sepsis. A case report and literaturereview L. Schneider*, M. Ehlinger, C. Stanchina, M.-C. Giacomelli, P. Gicquel, C. Karger, J.-M. ClavertOrthopaedics& Traumatology: Surgery & Research (2009) 95, page 237—242.
12. S. J. Libby, M. Lesnick, P. Hasegawa et al., "Characterization of the *spv* locus in *Salmonella enterica* serovar *Arizona*," Infection and Immunity, vol. 70, no. 6, pp. 3290–3294, 2002.
13. *Salmonella arizona* infections in Latinos associated with rattlesnake folk medicine. Waterman SH, Juarez G, Carr SJ, Kilman L. AJPH March 1990, Vol. 80, No. 3 page 289-289.
14. *Salmonella arizonae* in the United Kingdom from 1966 to 1990 M. L.M. Hall and B. Rowe. Division of Enteric Pathogens, Central Public Health Laboratory, 61 Colindale Avenue, LondonNW9 5HT (Accepted 29 July 1991)
15. *Salmonella enterica* serotype *arizonae*: a rare entity in neonatal meningitis D Juyal1*, VK Rathaur, N Sharma

16. Fatal Case of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* Gastroenteritis in an Infant with Microcephaly Rakesh Kumar Mahajan, Shoeb Akhtar Khan, Dinesh Singh Chandel, Navin Kumar, Charoo Hans, and Rama Chaudhry.
17. Shaw, C. (1956). Distinction between *Salmonella* and *Arizona* by Leifson's sodium malonate medium. Int. Bull. bact. Nom. Tax. 6, 1.
18. Пименов Н.В., Лаишевцев А.И., Пименова В.В. Особенности аризоноза индеек. Идентификация сальмонелла-инфекции в инкубационном яйце и продуктах индейководства // RJOAS, 10(46), 2015, стр. 9-17.
19. Совершенствование ветеринарно-санитарной экспертизы продукции индейководства, основанное на биохимических особенностях *Salmonella Arizonae*. Сборник науч. трудов Междунар. уч.-метод. и науч.-практ. конф., посвящ. 95-летию каф. паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы: 11-13 ноября 2015 г. г. Москва, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И.Скрябина – М.: «ЗooВетКнига», 2015. – С.244-248. Пименов Н.В., Лаишевцев А.И.