DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-04.33>

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЭПИЗООТИЧЕСКОГО И
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В ПТИЦЕВОДЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ
НА ПРИМЕРЕ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ**
MODERN METHODS OF EPIZOOTIC AND EPIDEMIOLOGICAL
MONITORING IN THE POULTRY INDUSTRY ON THE EXAMPLE OF SALMONELLA
INFECTION

Пименов Н.В., профессор
Pimenov N.V., Professor

**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

Лаишевцев А.И.*, аспирант
Laishevtcev A.I., Post-graduate student

**Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии имени Я.Р. Коваленко, Москва, Россия**
All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine
named after Y.R. Kovalenko, Moscow, Russia

*E-mail: a-laishevtsev@bk.ru

АННОТАЦИЯ

Мониторинг сальмонелла-инфекции, быстрый и точный диагноз в случаях заболеваемости является первым основным элементом профилактики и борьбы с сальмонеллезом сельскохозяйственных животных, в том числе птиц. Поскольку проведение мониторинговых исследований позволяет обеспечить минимизацию рисков возникновения заболевания, то особое внимание должно уделяться актуализации и совершенствованию существующих методов и средств исследований. В данной работе описаны принципы и подходы к проведению эпизоотического мониторинга сальмонеллеза в птицеводческой отрасли.

ABSTRACT

Monitoring of salmonella infection, a rapid and accurate diagnosis in cases of morbidity is the first major element of prevention and control of salmonella in farm animals, including birds. Since conducting monitoring studies allows minimizing the risks of disease, special attention should be paid to actualization and improvement of existing methods and means of research. In this paper, the principles and approaches to carrying out epizootic monitoring of salmonellosis in the poultry industry are described.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Птицеводство, диагностика, продовольственная безопасность, национальная безопасность.

KEY WORDS

Poultry, diagnostics, food safety, national security.

В соответствии с общепринятым мнением мониторинг – это постоянное наблюдение за каким-либо процессом с целью выявления его соответствия желаемому результату или первоначальному предположению. Именно поэтому мониторинг сальмонеллезной инфекции стоит подразделить на три части. Во-первых,

птицеводческое предприятие должно стремиться к самостоятельному контролированию поступающей продукции и сырья с целью предотвращения заноса (ввоза) возбудителя инфекции. При этом мониторинг проводит непосредственно птицеводческое предприятие, и чаще всего он сводится к анализу информационных данных об эпизоотическом благополучии того или иного производителя. Во-вторых, самостоятельно отслеживать состояние здоровья своего птицепоголовья и безопасность производимой продукции [2, 6]. В отношении сальмонеллёзной инфекции в промышленном птицеводстве данный пункт применим в достаточно ограниченном количестве предприятий, ввиду отсутствия собственной лаборатории. Кроме того экспресс-диагностика сальмонеллёза в условиях предприятия позволяет провести только кровекapельную реакцию гемагглютинации с использованием пуллорного антигена, адаптированную лишь для пуллорной инфекции. В остальных случаях экспресс-диагностика не может быть реализована непосредственно на предприятии и требует участия профильной ветеринарной лаборатории. В-третьих, мониторинг сальмонеллёзной инфекции подразумевает государственный контроль благополучия сельскохозяйственных, в т.ч. птицеводческих предприятий, а также приусадебных хозяйств. В этом отношении государственный ветеринарный лабораторный мониторинг подразумевает систематические лабораторно-диагностические исследования продовольственного сырья животного происхождения, предназначенного для производства пищевых продуктов для человека, продукции животного происхождения, кормов и кормовых добавок для животных. Эти исследования проводят учреждениями федерального органа исполнительной власти, осуществляющего функции по контролю и надзору в сфере ветеринарии, уполномоченного на проведение государственного контроля (надзора) в области ветеринарии, в соответствии с ежегодно утверждаемыми в установленном порядке планами согласованными решениям Евразийской экономической комиссии от 09.10.2014 №94 «О Положении о едином порядке проведения совместных проверок объектов и отбора проб товаров (продукции), подлежащих ветеринарному контролю (надзору)». Эта часть мониторинга в первую очередь подразумевает массовое проведение лабораторно-диагностических исследований всеми существующими методами [12].

Диагностика сальмонеллёзов птицы подразумевает анализ эпизоотологических данных, клинических признаков и патоморфологических изменений, на основании которых устанавливается предварительный диагноз. Окончательная постановка диагноза производится при помощи лабораторных методов диагностики. Так, в настоящее время среди лабораторных тестов разработаны экспресс-методы, позволяющие выявлять антиген или специфические к нему антитела в крови больной птицы: полимеразная цепная реакция (ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА), кровекapельная реакция непрямой гемагглютинации с цветным комплексным пуллорным антигеном (ККРНГА) для диагностики пуллороза-тифа кур. Однако в случае положительного результата экспресс-теста окончательный диагноз может быть поставлен лишь на основании классических лабораторных бактериологических исследований с выделением возбудителя, его видовой и серовариантной идентификацией и, при необходимости, подтверждения его патогенности в биологической пробе [5, 16].

Лабораторная диагностика сальмонеллёза производится как прижизненно, так и посмертно. Прижизненная диагностика подразумевает использование серологических, молекулярно-генетических и бактериологических методов. К серологическим методам относят иммуноферментный анализ, кровекapельную реакцию непрямой гемагглютинации с цветным комплексным пуллорным антигеном (ККРНГА) для диагностики пуллороза-тифа кур. Ранее применялись методы иммунофлюоресценции (РИФ) и реакция латекс-агглютинации (РЛА), но в данный момент наборы, обеспечивающие проведение этих реакций, для ветеринарной практики не производятся. Тем не менее, ввиду того, что РИФ и РЛА нацелены на выявление не

антител, а антигенов существует возможность использования для постановки этих реакций медицинских компонентов [19, 23].

Существующие коммерческие наборы ИФА для количественного обнаружения титра антител к возбудителю сальмонеллёза, зарегистрированные на территории Российской Федерации, имеют строгую видовую и серотиповую предрасположенность. Так, для ИФА диагностики сальмонеллёза птиц имеются коммерческие наборы *BioChek CK117 Salmonella enteritidis*, *BioChek CK118 Salmonella typhimurium*, *BioChek CK218*, *CK220 Salmonella enter.*, *IDEXX SE Ab Test*, набор для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп *B* и *D* в сыворотках крови кур иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении ВНИИЗЖ.

К молекулярно-генетическим методам исследования относится полимеразная цепная реакция (ПЦР). В настоящее время существуют коммерческие наборы для обнаружения сальмонелл в фекалиях. Данный метод содержит некоторые ограничения в виде запрета проведения антибактериального и химиотерапевтического лечения перед взятием материала для исследования. К свободно реализуемым на территории Российской Федерации можно отнести следующие ПЦР-наборы для диагностики сальмонеллёза: *BAX® Salmonella detection system*, *SureFast® Pathogen Salmonella PLUS* для определения сальмонелл, *SureFast® Salmonella Serotype 3plex* для детекции и дифференциации *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* и внутреннего контроля, ПЦР САЛЬМОНЕЛЛА-РВ, предназначенный для количественного обнаружения *in vitro* ДНК возбудителя сальмонеллеза в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результата в режиме реального времени, АриаДНА-*Salmonella enterica* и другие. Приведённые наборы преимущественно используются в медицинской практике [21, 22].

Иммунохроматографическая диагностика сальмонеллёза в птицеводстве не является распространённым методом диагностирования заболевания, тем не менее, ИХА наборы существуют и широко используются в медицинской практике. В частности, речь идёт о наборе Российского производства – «Тест иммунохроматографический для выявления *Salmonella spp.* в кале», предназначенном для *in vitro* одноэтапного быстрого качественного выявления *Salmonella enteritidis* и *Salmonella typhimurium* (*Salmonella spp.*) в кале. Иностранным аналогом данного теста является *Singlepath-Salmonella* – Экспресс-тест на сальмонеллы, Германия (*Merck KGaA*). Принцип метода основан на том, что анализируемый образец биологического материала находящегося в жидком состоянии адсорбируется на участке полоски теста. В случае наличия в исследуемом материале бактерий вида *Salmonella enteritidis* и/или *Salmonella typhimurium* происходит взаимодействие данного бактериального антигена с высокоспецифичными конъюгированными моноклональными антителами. Образовавшийся комплекс продолжает движение по капилляру с током жидкости до аналитической части тест полоски, на которой находятся иммобилизованные в качестве подложки моноклональные антитела. Результатом данной реакции является адсорбция клеток сальмонелл в аналитической части теста с образованием окрашенного иммунного комплекса, фиксирование которого происходит визуально без потребности в дополнительном оборудовании. При положительном тесте на тест-полоске происходит образование двух темных линий, одна из которых является положительным контролем, вторая – анализируемым образцом. При отрицательном результате происходит образование одной линии. Использование данного метода позволяет получить результат в течение 20 минут, специфичность тестов составляет 99% [14].

Бактериологическое исследование материала с целью исключения сальмонеллёза можно проводить как прижизненно, так и посмертно. Бактериологическое исследование подразумевает под собой выделение чистой культуры сальмонелл с использованием рутинных методов. Преимуществом серологических и молекулярно-генетических методов является возможность

проведения экспресс-исследования и более низкая стоимость, недостатком этих методов является специфичность самих наборов, позволяющая подтверждать наличие в организме титров антител к определённым серовариантам сальмонелл. В случае предварительной вакцинации весьма затруднительна интерпретация результатов определения титров антител. Из недостатков бактериологического метода стоит также отметить длительность и относительно высокую стоимость исследования [3].

Преимуществом бакисследования является то, что данный метод является наиболее достоверным для определения возбудителя болезни, в т.ч. возможности определения сероварианта изолята сальмонелл. Кроме того, использование данного метода позволяет провести подтитровку антибактериальных средств или средств на основе бактериофагов для подбора эффективных лечебно-профилактических методов и препаратов, т.е. провести исследование чувствительности возбудителя к антибиотикам и бактериофагам [13, 17, 18, 30].

Методы бактериологического исследования являются приоритетными при окончательной постановке диагноза на сальмонеллёз, все остальные методы рассматриваются как вспомогательные. В отношении проведения плановых мониторинговых исследований наиболее целесообразно проведение ИФА диагностики, позволяющее одновременно произвести большое количество исследований с последующим проведением бактериологического анализа при обнаружении положительных реакций в ИФА. Кроме того серологическая диагностика (ККРНГА, ИФА, РИФ, РЛА) имеет значение преимущественно для эпидемиологических исследований и определения связи осложнений с перенесенной инфекцией.

Серологические методы лабораторной диагностики в птицеводстве служат большим образом экспресс-средством выявления больной птицы или птиц-бактерионосителей. В частности, при работе в условиях птицефабрики обязательным условием для ветеринарной службы предприятия является самостоятельный контроль птицепоголовья на пуллороз путём воспроизведения кровякапельной реакции непрямой гемагглютинации. Кровякапельная реакция непрямой гемагглютинации (ККРНГА) является наиболее распространённым методом серологической диагностики пуллороза-тифа птиц. Суть исследования заключается в обнаружении при помощи эритроцитарного антигена антител к *S. gallinarum-pullorum* в сыворотке крови птицы. Для проведения исследования производится отбор крови у птицы из гребня или подкрыльцовой вены. Затем каплю полученной крови наносят на обезжиренное и сухое предметное стекло и добавляют равный объём эритроцитарного антигена. Равномерное смешивание двух жидкостей происходит при медленном покачивании предметного стекла на грелке-качалке, работающей с температурным режимом +37...+40 °С. Положительной считается реакция при обнаружении в смешанном растворе двух жидкостей хлопьев коричневого цвета в течение 2 минут после начала покачивания. При обнаружении слабовыраженных мелкозернистых хлопьев коричневого цвета за данный период реакция признаётся сомнительной. Отрицательное значение реакции признаётся в случае образования гомогенной взвеси без выпадения хлопьев [25, 29].

Заблаговременно за 5-7 дней до проведения подобного исследования в рационе птицы минимизируется количество белков, рыбьего жира, антибиотиков и иных лекарственных средств для предупреждения неспецифических реакций.

Несмотря на широкое распространение данного метода диагностики пуллороза нами были зафиксированы и описаны случаи неспецифичности данного антигена. В частности при проведении мониторинговых исследований на частных птицеводческих предприятиях Кировской, Тамбовской и Орловской областей в течение 2016 года был выявлен ряд случаев, когда воспроизведение пуллорной реакции давало ложно положительный результат, что было подтверждено рядом бактериологических исследований и сопутствующим подтверждением в ИФА.

В результате проведенного исследования было установлено наличие неспецифических реакций антигена пуллорного эритроцитарного с кровью птицы, экспериментально заражённой несколькими видами бактерий: *Proteus vulgaris*,

Morganella morganii и *Escherichia coli* серогруппы O138, при отсутствии положительного результата на сальмонеллезные антитела в ИФА. Наличие неспецифической реакции пулзорного антигена с кровью кур, не инфицированных сальмонеллами, можно считать следствием наличия близких антигенов у энтеробактерий, в частности *E. coli*, *M. morganii*, *P. vulgaris* и *S. pullorum*, что подтверждается филогенетической связью между ними.

При проведении периодических обследований поголовья птиц в опытных хозяйствах установлено, что неспецифические реакции с пулзорным антигеном в большинстве случаев происходят только у птиц, вновь введенных в стадо (как правило, это куры-молодки, ежегодно сменяющие часть выбывающей перерой птицы (кур после первого года яйцекладки). У птицы, находящейся в стаде более месяца, наличие неспецифических реакций не наблюдалось. Это можно объяснить тем, что введенная в поголовье птица продуцирует антитела к возбудителям, циркулирующим на территории хозяйства. Ввиду того, что возбудители являются сапрофитными и оппортунистическими патогенами, развитие клинических признаков и проявление патологического процесса не наблюдается.

В условиях промышленных предприятий такая неспецифическая реакция нами не зафиксирована, что может объясняться тем, что формирование групп птиц на птицефабриках происходит единократно, без последующего введения в поголовье молодых особей.

Иммуноферментный анализ (ИФА) является наиболее достоверным серологическим методом, позволяющим определять титр специфических антител в исследуемой сыворотке крови животного или птицы. Этапы постановки ИФА должны производиться в полном соответствии с утверждённой на набор инструкцией. Основной принцип анализа заключается в выявлении комплекса «антиген-антитело», образовавшегося на поверхности лунок полистиролового планшета. Специфический комплекс взаимодействует с антивидовым иммунопероксидазным конъюгатом против иммуноглобулинов и вызывает разложение субстрата, окрашивая содержимое лунок планшета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антител в исследуемом материале. Учет результатов реакции проводится в течение 5-15 минут после ее постановки с помощью спектрофотометра. Использование такого метода позволяет дифференцировать испытуемые сыворотки на категории положительно или отрицательно реагирующих и определить титр испытуемой положительно реагирующей сыворотки.

Использование данного метода диагностики сальмонеллёза для некоторых групп птиц не всегда является объективным. В случае использования данного метода для вакцинированных кур-несушек невозможно определить принадлежность антител к циркулирующему возбудителю или иммуногенной активности препарата. Для бройлерного поголовья вакцинация не является возможной ввиду сжатого срока откорма птицы, поэтому для данной группы иммуноферментный метод имеет наибольшее значение в качестве мониторинговых исследований.

В дополнении хочется отметить более высокую чувствительность данного метода в сравнении с кровякапельной реакцией гемагглютинации и более широкую серовариантную специфичность этого метода. Как уже было сказано выше, нами были зафиксированы случаи получения неспецифического результата кровякапельной реакции, в то время как иммуноферментный метод позволил получить достоверный результат. Но, здесь же, надо отметить, что при этом использование данного метода не всегда представляется возможным в условиях производственных условий ввиду необходимости наличия специального оборудования и квалифицированных кадров. Иммуноферментный анализ является более дорогостоящим при воспроизведении. Данный метод преимущественно используется при проведении государственных ветеринарных мониторингов ввиду возможности проведения одномоментного исследования большого количества проб, получения результата исследования в течение 3-4 часов после получения сыворотки крови. Кроме приведенных преимуществ можно отметить возможность длительного хранения образцов сыворотки крови, что

зачастую является необходимым в случае возникновения спорных вопросов. Так, нами было установлено, что при повторном исследовании с использованием наборов BioChek изначально положительных проб сывороток крови, хранившихся в течение 60-75 суток в замороженном состоянии при температуре -14... -18 °С, падение титров антител не превышало 10% от первоначальных значений.

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) имеет несколько разновидностей метода: прямой, непрямой.

Прямой метод РИФ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, меченными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа. Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета.

Непрямой метод РИФ заключается в выявлении комплекса «антиген - антитело» с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченной флюорохромом. Для этого мазки из взвеси микробов обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флюорохромами. В результате образуется комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе.

Реакция латексной агглютинации (РЛА) основана на агглютинации микрочастиц латекса, покрытых молекулами антиген/антитело, в результате связывания с антителом соответствующего антигена из исследуемой сыворотки.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – высокоспецифичный метод амплификации *in vitro*, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходную в миллионы раз. ПЦР позволяет проводить экспресс-диагностику сальмонеллеза у животных и птиц, исследуя фекалии. Данный метод обладает высокой чувствительностью и, в то же время, не требует подобно серологическим методам наличия иммунного ответа на проникновение возбудителя в организм хозяина, что дает возможность следить за ранними стадиями инфекции и выявлять латентную форму болезни.

Во Всероссийском государственном научно-исследовательском институте контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов разработана тест-система «САЛ-КОМ» для диагностики сальмонеллеза методом ПЦР (Утверждена Департаментом ветеринарии РФ 15.08.2001 г. Наст. №13-5-02/0163). Тест-система предназначена для выявления ДНК бактерий рода *Salmonella* в крови, молоке, фекалиях, продуктах убоя животных, мясных продуктах и кормах животного и растительного происхождения. Чувствительность метода – 10 бактерий в 1 мл исследуемой пробы, специфичность – 100%. В основе метода лежит амплификация специфического участка ДНК микроорганизмов рода *Salmonella* за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента *Taq*-полимеразы. Не смотря

Высокая чувствительность метода является как его преимуществом, так и недостатком, ограничивающим применение на фоне вакцинаций, особенно живыми вакцинами. Метод требует дорогостоящего оборудования и специальной лаборатории, поэтому пока не столь широко применяется на практике. Наиболее востребован метод ПЦР при мониторинговых исследованиях инкубационных яиц в птицеводстве, где наличие возбудителя во многих случаях не выявляется бактериологическими исследованиями.

Окончательно поставить диагноз – сальмонеллёз при исследовании клинического и/или секционного материала, становится возможным при проведении лабораторной диагностики бактериологическими методами, целью которых является выделение из

исследуемого образца чистой культуры возбудителя болезни с ее последующей идентификацией и серотипированием. Весь процесс проведения бакисследования состоит из следующих этапов: пробоподготовка материала, обогащение на забуференной пептонной воде, селективное обогащение, посев на плотные питательные среды, биохимическая идентификация возбудителя, антигенная типизация возбудителя, определение патогенности в биопробе.

Показаниями к проведению бактериологического исследования на сальмонелллез является необходимость диагностирования инфекции, выявления сальмонелл-носительства, определение обсемененности объектов окружающей среды, а также анализ эпидемической и эпизоотической ситуации. Кроме того бактериологическое исследование должно проводиться во всех случаях выявления положительных реакций в серологических и молекулярно-генетических тестах с целью подтверждения результата исследования. При отборе проб клинического и/или патологического материала стоит принимать к сведению, что исследование образцов от животных и птиц, проходивших курс антибиотикотерапии, не приведёт к получению достоверного результата [4, 10, 15].

Прижизненное бактериологическое исследование на сальмонелллез птицы подразумевает отбор в качестве образцов испражнений или крови. Отбор фекалий производится непосредственно после акта дефекации. В случае обнаружения в каловых массах слизи, желчи или сгустков крови они обязательно включаются в отбираемый образец [26].

Павшая птица должна направляться в лабораторию целиком в количестве не менее 5 голов. В дополнении к павшей птице необходимо отправить 5 голов живой птицы с клиническими признаками сальмонелллёза. Из инкубаториев в лабораторию направляют погибшие эмбрионы птиц в 12-18-дневном возрасте в количестве до 30 штук, из которых в последующем делаются высевы из хорион-аллантоисной жидкости и желтка погибших эмбрионов. Единовременное помещение различных образцов в одну упаковочную тару не допускается. Каждому отобранному образцу присваивается индивидуальный номер с последующим указанием его в сопроводительном документе [20].

В качестве объектов для исследования с целью выявления источника распространения инфекции стоит производить отбор кормов и воды, скормливаемых птице, а также смывов с оборудования и инвентаря для ухода за птицей. Необработанные дезинфектантами сточные воды, так же позволяют произвести выделение бактериального агента. На практике объективность результатов исследований зачастую нарушается вследствие несоблюдения регламента отбора проб, их консервирования при необходимости и транспортировки материала. Транспортирование в лабораторию образцов патологического и клинического материала должно быть произведено не позднее 12 часов с момента отбора проб при температурном режиме $+2...+8$ °C. Уменьшение срока транспортировки полученных образцов приводит к снижению рисков получения ложного результата. При отсутствии возможности доставки образцов в лабораторию в указанный период положительный опыт позволяет нам рекомендовать попутный отбор образцов материала на транспортные среды Амiesа с активированным углем, а сам патологический материал подвергнуть консервированию 30%-ным водным раствором глицерина или однократным замораживанием при температурном режиме не ниже -18 °C [7, 8, 27, 28].

Этапы проведения бактериологического исследования проб клинического и патологического материала приведены на схеме (рис. 1).

Первичное обогащение сальмонелл позволяет произвести достаточное накопление бактериальных клеток, изначально находящихся в минимальной концентрации в анализируемом образце. Исследуемый материал перед внесением в забуференную пептонную воду необходимо предварительно измельчить и гомогенизировать. Селективное обогащение способствует подавлению всех выросших на забуференной пептонной воде бактерий, за исключением сальмонелл и некоторых колиформных бактерий, в частности бактерий рода *Escherichia spp.*

Рисунок 1 – Общая схема исследования патологического и клинического материала от птиц на сальмонеллёз

Высев на агаризированные дифференциально-диагностические среды – Эндо, Плоскирева, висмут-сульфитный агар, ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар, сальмонелла-шигелла агар, агар МакКонки, бриллиант-грюн агар и иные хромогенные агары для энтеробактерий, – наиболее важный этап анализа, позволяющий выделить и произвести родовую идентификацию возбудителя. Типичность роста сальмонелл на дифференциальных питательных средах приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Типичность роста колоний сальмонелл на различных дифференциально-диагностических питательных средах

Название среды	Вид колоний сальмонелл
Бриллиант-грюн агар	Розовые
Мак-Конки агар	Бесцветные
Ксилозо-лизин-дезоксихолатный агар	Черные с бесцветным ободком, за исключением <i>S. typhi</i> , которые растут в виде светлых колоний
Сальмонелла-шигелла агар (SS)	С черным центром
Висмут-сульфитный агар	Черные, среда под колонией прокрашивается. Некоторые серовары сальмонелл (<i>S. paratyphi A</i> , <i>S. gallinarum</i> могут быть слегка зеленоватыми)
Агар Эндо	Бесцветные, слегка розовые
Агар Плоскирева	Бесцветные, слегка розовые, иногда с черным центром

Кроме приведённых общедоступных питательных дифференциально-селективных сред для сальмонелл нами в ходе проведения исследований была также отмечена высокая селективно-дифференциальная способность у следующих сред:

1. Среды Раджа-Ханса индийского производства *Himedia*, использование которой позволяет обнаруживать бактерии *Salmonella enteritidis* и *S. typhimurium* в виде обильного роста колоний красного цвета, при том, что бактерии *Salmonella typhi* проявляют обильный рост бесцветных колоний;
2. Хромогенного агара для сальмонелл – *HiCrome Salmonella Agar* производства фирмы *Himedia*. На данной среде *Ss. enteritidis*, *typhi* и *typhimurium* демонстрируют обильный рост колоний светло-лилового цвета с небольшим ореолом;
3. *HiCrome MS.O157 Agar* хромогенного агара для *E. coli O157* производства фирмы *Himedia*. На данной среде *S. enteritidis* демонстрирует хороший рост колоний красного цвета;
4. Хромогенного агара ММ для сальмонелл, на котором *Ss. enteritidis* и *typhimurium* демонстрируют обильный рост в виде колоний с чёрным центром;
5. Хромогенного агара для сальмонелл (основа)/*OSCM* производства *Oxoid* Великобритании, позволяющего выявлять рост бактерий рода *Salmonella* в виде обильного роста колоний пурпурного цвета размером 1,0-1,5 мм. При этом данная питательная среда на культуральном уровне позволяет дифференцировать сероварианты *S. arizonae* и *S. indiana*, так как рост этих сальмонелл проявляется в виде сине-голубых колоний.

Таблица 2 – Биохимические свойства различных родов семейства Enterobacteriaceae

Тест или субстрат	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Serratia</i>	<i>Proteus</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Erwinia</i>
Сероводород	-	-	+, -	+, -	-	-	-	-	+, -	-	+	-, +
Лактоза	+, -	-	-, +	X	+	+	-, +	-, +	-	-	-	X
Глюкоза (газ)	+, -	-	+, -	+	+	+	+, -	-, +	+, -	-	+	-
Мочевина	-	-	-	X	-	(+), -	-	X	+, -	+, (+)	-	-
Мочевина (по Преусу или Кристенсену)	-	-	-	X	(+)	(+), -	-	X	+, -	+	-	-
Подвижность	+, -	-	+, -	+	-	+	X	+	+, -	-	+	+, -
Индол	+, -	-, +	-	-, +	+, -	-	-	-	+, -	-, +	+	-
Фенилаланиндезаминаза	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	X
Цитрат Симонса	-	-	+, -	+	+	+	X	+	X	-	-	+
Ацетат натрия	+, (+)	-	X	X	+	+	-, (+)	X	X	X	X	X
Лизиндекарбоксилаза	+, -	-	+, -	-	+	-, +	+	+	-	-	+	-
Орнитиндекарбоксилаза	X	-, +	+	X	-	+	+	+	-, +	X	+	-
Среда Кларка: Реакция с метиловым синим	+	+	+	+	-, +	-	+	X	+	+	+	-
Реакция Фогес-Проскауэра	-	-	-	-	+, -	+	X	X	-	-	-	X
Сорбит	X	X	+	+	+	+	-	+	-, +	X	-	X

Условные обозначения:

«+» - положительная реакция у 90% штаммов и более;

«-» - отрицательная реакция у 90% штаммов и более;

«(+)» - замедленная (позже 24 часов) положительная реакция у 90% штаммов и более;

«+», «-» - чаще положительная реакция, реже отрицательная - 90% штаммов или более;

«-», «+» - чаще отрицательная реакция, реже положительная реакция у 90% штаммов;

«+», «(+)» - чаще положительная, реже замедленно положительная реакция у 90% штаммов;

«-», «(+)» - чаще отрицательная, реже замедленная положительная реакция у 90% штаммов и более;

«X» - различные результаты реакций: «+», «(+)», «-».

Биохимическую идентификацию бактерий осуществляют методами идентификации при помощи сред с сахарами Гисса или коммерческими наборами для идентификации энтеробактерий (тест-наборы, диски и полоски для биохимической идентификации бактерий: коммерческие наборы для биохимической идентификации

энтеробактерий – *Microbact 12E*, *24E*, ЭНТЕРО тест 24 Н, *Api 20E*, *Remel Rapid ONE*). Биохимические свойства различных родов семейства Enterobacteriaceae приведены в табл. 2.

Продолжительность этапа биохимической идентификации зависит от средств, используемых для идентификации. Так, использование стандартных сахаров Гисса и *Microbact 12E*, *24E*, *Api 20E* при наличии суточной культуры возбудителя позволит идентифицировать его в течение 18-24 часов. Использование наборов *Remel Rapid ONE* позволяет произвести экспресс-идентификацию возбудителя в течение 4 часов.

На данный момент времени существуют иные методы видовой идентификации сальмонелл – секвенирование, масс-спектрометрия. Тем не менее, данные методы, как и метод биохимической идентификации, не способны дать 100% достоверный результат типирования при определении серовара сальмонелл, но являются подходящими для определения родовой и видовой принадлежности. Определение серовара происходит благодаря изучению антигенной структуры сальмонелл.

Серотипирование сальмонелл происходит благодаря определению соматического и жгутикового антигена с использованием коммерческих агглютинирующих сывороток. Методика проведения исследования подробно приведена в методических указаниях 4.2.2723-10 «Лабораторная диагностика сальмонеллез, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды». Суть реакции заключается в выявлении комплекса «антиген-антитело» благодаря визуальному обнаружению хлопьев агглютинации на предметном стекле. На предметное стекло наносится одна капля сыворотки и одна капля изотонического раствора хлорида натрия. С питательного агара берется полная петля культуры, выращенной в течение 18-24 часов при 37 °С. Культура вносится на предметное стекло вблизи капли изотонического раствора хлорида натрия и эмульгируется (контроль на отсутствие спонтанной агглютинации). При отсутствии спонтанной агглютинации манипуляцию повторяют в капле О-сыворотки, формируя равномерную непрозрачную суспензию. Учет результатов проводят в течение 1-2 минут, мягко покачивая стекло. Гомогенная суспензия свидетельствует об отрицательном результате. Образование хлопьев агглютината внутри капли расценивается как положительный результат. Агглютинация проявляется через несколько секунд (или 1 минуту) в виде хлопьев (зерен) агглютината формирующихся внутри капли на фоне ее просветления. Штаммы, находящиеся в «R»-форме, обладают самопроизвольной агглютинацией. Их дальнейшее серотипирование не представляется возможным без дополнительных манипуляций. Такие штаммы пересевают на слабощелочной агар для того, чтобы выбрать колонию с ровными краями и вернуть штамм в «S»- (гладкую) форму и повторить агглютинацию. Если агглютинация с поливалентными О-сыворотками не происходит, то вероятность того, что штамм относится к роду *Salmonella*, минимальна.

При проведении бактериологического исследования клинического и (или) секционного материала на сальмонеллез стоит принимать во внимание особенности некоторых серовариантов данного возбудителя. В случае проведения бактериологического исследования проб, полученных от импортированных в страну пород индюшек и овец, а также субпродуктов необходимо учитывать биохимические особенности сероваров подвидов *S. arizonae* и *S. diarizonae*, которые чаще являются лактозоположительными и ложно идентифицируются как *E. coli* благодаря специфическому металлическому блеску на среде Эндо [1, 11].

В процессе проведения нашей исследовательской работы в ходе бактериологических исследований был отмечен ряд особенностей сальмонелл аризона, отличающих их от других представителей рода. Так, при использовании тест-системы *Microbact12E* фермент *ortho-Nitrophenyl-β-galactoside* (ONPG) даёт положительный результат, что в свою очередь указывает на возможность штаммов данного подвида сальмонелл сбраживать лактозу. На питательном агаре Эндо исследуемые штаммы *S. arizonae* и *S. diarizonae* имели металлический блеск у колоний, свойственный для *E. coli*, что в свою очередь говорит о том, что обе культуры

являются лактозоположительными. Это свойство отличает возбудителя от сальмонелл других видов и подвидов рода *Salmonella*, наиболее распространенных возбудителей сальмонеллеза птиц.

Следующей отличительной чертой, которую мы отмечали при культивировании культур сальмонелл подвида *Arizonae*, стала их положительная бета-глюкуронидазная активность, наблюдаемая на питательной среде *OXOID CM1007*. Ранее нами уже было описаны свойства серовариантов сальмонелл данного подвида. Так при культивировании в течение 24 часов при температурном режиме 37 °С культура сальмонеллы данного штамма приобрела синий цвет, в то время как иные штаммы сальмонелл имеют преимущественно пурпурную окраску. Изоляты и штаммы бактерий рода *Salmonella* подвида *Arizonae* имеют нетипичный для остальных подвидов данного рода биохимический профиль. Эти явления требуют изменений методики бактериологических исследований при ветеринарно-санитарной экспертизе, где критерием выявления сальмонелл или колиформных бактерий служит характерный рост на агаре Эндо и других дифференциальных средах. Наиболее наглядно это можно увидеть на дифференциальных средах для энтеробактерий. Так, на среде Эндо *S. arizonae* имеют металлический блеск, что обусловлено возможностью сбраживать лактозу. Помимо сероваров *Arizonae* данной возможностью обладают серовары подвида *Diarizonae*. Положительная бета-глюкуронидазная активность сероваров свойственна многим штаммам подвидов *Arizonae* и *Diarizonae* – синий цвет колоний на специальной питательной среде является для них более характерным. Также для сальмонелл подвидов *Arizonae*, *Diarizonae* вида *S. enterica* и, кроме них, вида *S. bongori* свойственна положительная бета-галактозидазная активность. Данные качества не характерны для сальмонелл других серовариантов вида *S. enterica*, в т.ч. основных этиопатогенных вариантов для птиц – *Ss. enteritidis*, *typhimurium*, *pullorum*, *gallinarum*, *kentucky*, *infantis*, *anatum*. Для выявления бета-галактозидазной активности возможно использование тест-системы ЭНТЕРО тест 24 Н. Кроме того, с использованием данной тест-системы возможно выявление свойства утилизации культурой малоната натрия. Положительная реакция малонатного теста проявляется у сероваров подвидов *Arizonae*, *Diarizonae* и *Salamae* [9].

Гидролиз желатина свойственен для *Arizonae*, *Diarizonae*, *Salamae* и *Houtenae*. Данное свойство не характерно другим сальмонеллам, в т.ч. основным этиопатогенам для птиц. Указанные особенности становятся все более актуальными при бактериологических исследованиях, т.к. в меняющейся эпизоотической обстановке в нашей стране возрастает роль новых, нетрадиционных для нас возбудителей сальмонеллеза [24].

Постановка биопробы при выявлении сальмонелл позволяет установить точную связь причины проявления болезни с сальмонеллезным инфицированием. Для биопробы используют белых мышей, *SPF* цыплят или голубей. Выделение сальмонеллы адаптированного сероварианта в чистой культуре из крови сердца, головного мозга и желчи не требует постановки биопробы. Причина болезни (гибели) птицы в таком случае становится очевидна без контрольного заражения.

Изученные нами штаммы бактерий рода *Salmonella* подвида *Arizonae* не являлись вирулентными для белых мышей в достаточно больших концентрациях. Тем не менее, исследованные штаммы оказались способны вызвать сальмонелла-инфекцию в лабораторных условиях у индеек. Наиболее восприимчивой из подобранных возрастных групп оказалась птица в возрасте 28 дней. У данной птицы проявились типичные для сальмонелллёза клинические признаки. Более взрослая птица перенесла инфицирование в латентной форме.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Ali Shariati M. Improvement of allocation and identification of *Salmonella entericabacteria* of *arizonae* subspecies. //International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences. 2016. №5 (3). С. 342-348.

2. Burlakov S.V. Tasks of veterinary service to ensure the biological safety of poultry products in the Russian federation: analysis and assessment of risks. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. T. 59. №11. C. 181-185.
3. Cherkassky B.L. Salmonellosis: some recent problems in Russia. // Medical Microbiology Letters. 1996. T. 5. №6. C. 323-326.
4. Haddock R.L. Infant diet and salmonellosis.// American Journal of Public Health. 1991. T. 81. C. 997-1000.
5. Kolesnikova Y.N. Prophylaxis of salmonellosis of farm animals and poultry: the main directions and means. //Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. T. 60. №12. C. 247-254.
6. Kovaleva E. Phage detection of pathogen microorganisms in agricultural ecosystems monitoring as part of sectoral foresight.// International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 2016. T. 7. №S2. C. 247-249.
7. Kovaleva E.N. Ecosystems' monitoring with purpose for phage detection of pathogen microorganisms as part of agricultural foresight.// Advances in Environmental Biology. 2016. T. 10. №3. C. 1-3.
8. Kuteynikova N.S. Antibiotic resistance of field isolates of pseudomonas aeruginosa isolated from exotic and ornamental birds. //Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. T. 55. №7. C. 3-7.
9. Lenev S.V. Improvement of allocation and identification of salmonella enterica bacteria of arizonae subspecies.// Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. T. 50. №2. C. 14-23.
10. Lisova V. Pathoanatomical changes in calves at acute Salmonellosis.// Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького. 2016. Т. 18. №1-2 (65). С. 82-86.
11. Pimenova V.V. The identification of salmonella infection in hatching eggs and products of turkey-keeping.// Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2015. T. 46. №10. C. 9-17.
12. Pimenova V.V. The role of farming poultry's salmonella pathogens in infection and pathology of human disease. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017. T. 62. №2. C. 282-289.
13. Regina T. The results of the identification of bacteria isolated from the digestive tract of birds Melopsittacus undulatus of home content.//International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 2016. T. 7. №S3. C. 147-151.
14. Saidkasimova N.S. Modern problems of epidemiological process of Salmonellosis in Uzbekistan.//Профилактическая и клиническая медицина. 2009. №2. C. 193-194.
15. Spivak Ya. N. Effect of interferons on salmonellosis (experimental and clinical studies). // Антибиотики и химиотерапия. 1992. Т. 37. №3. С. 28-31.
16. Tatarenko Y.S. The study of pathogenic properties of enterobacterial flora of clinically healthy quails for possible detection of bacteriocarrier.// Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. T. 56. №8. C. 67-73.
17. Yakimova E.A. Microbial profile of the digestive canal of budgerigars (Melopsittacus undulatus).// Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. T. 53. №5. C. 76-82.
18. Амбражеевич Ю.В. Эффективность применения бивалентного бактериофага против сальмонеллеза для обезвреживания продуктов убоя в птицеводстве. /Ветеринария, зоотехния и биотехнология. -2014, №1. -С. 31-35
19. Капустин А.В. К вопросу этиологии эшерихиоза кур. // В сборнике: Вклад молодых ученых в решение проблем аграрной науки Материалы межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых. 2005. С. 157-159.
20. Колесникова Ю.Н. Методические рекомендации по профилактике и ликвидации сальмонеллёзов сельскохозяйственных животных, в том числе птиц. //ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, Москва 2016 г, 155 с.
21. Куриленко А.Н. Рекомендации по диагностике, профилактике и ликвидации сальмонеллеза кур. -М.: МСХ. /МГАВМиБ. -2002. -34 с.

22. Найденова Ю.В. Экспериментальная инфекция сальмонеллеза цыплят. /Вопросы ветеринарии и ветеринарной биологии: Сб. науч. тр. мол. ученых./МГАВМиБ. -М., 2001. -вып. 2. -С. 17-20
23. Пименов Н.В. Смешанная инфекция: сальмонеллез и болезнь Ньюкасла у голубей. // Ветеринарная медицина. 2004. №4. С. 23-24.
24. Пименов Н.В. Совершенствование ветеринарно-санитарной экспертизы продукции индейководства, основанное на биохимических особенностях *Salmonella arizonae*. // В сборнике: Сборник научных трудов международной учебно-методической и научно-практической конференции, посвященной 95-летию кафедры паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы 2015. С. 244-248.
25. Пименов Н.В. Изучение защитных и лечебных свойств бивалентного сальмофага против сальмонеллеза энтеритидис и пуллороза-тифа кур в лабораторных условиях. /Вопросы ветеринарии и ветеринарной биологии: Сб. науч. тр. мол. ученых. /МГАВМиБ. -М., 2001. -вып. 2. -С. 15-17
26. Прохорова Ю.В. Профилактика сальмонеллёза птиц. // Птицеводство. 2015. №6. С. 43-45.
27. Светоч Э.А. Биопрепарат на основе бактериофагов для профилактики и лечения сальмонеллеза животных. //патент на изобретение RUS 2232808 11.10.2002
28. Татаренко Я.С. Выявление бактерионосительства перепелов частного сектора в Московской, Тульской и Рязанской областях. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016. №9. С. 48-52.
29. Чиркова И.В. Биологические свойства бактериофагов против сальмонелл тифимуриум и их использование в борьбе с сальмонеллезом птиц. /Ветеринария и кормление. -2008, №3. -С. 32-34
30. Якимова Э.А. Антибиотикорезистентность музейных штаммов бактерий рода *Klebsiella* spp.//Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016. №5. С. 38-45.