

СТАТЬИ

УДК 579.678

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ
SALMONELLA, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ**

^{1,2}Бармак С.М., ²Синявский Ю.А., ²Бердыгалиев А.Б., ²Шарманов Т.Ш.,

³Менденхалл И.Х., ⁴Жолдыбаева Е.В.

¹Казахский Национальный университет им. Аль-Фараби, Алматы;

²Казахская академия питания, Алматы;

³Медицинская школа Duke-NUS, Сингапур;

⁴Национальный центр биотехнологии, Нур-Султан, e-mail: sabyr95@mail.ru

Проведена молекулярно-генетическая идентификация изолятов бактерий *Salmonella*, выделенных из продуктов питания. ПЦР анализ с видоспецифичным праймером S Inv-1F и S Inv-1R показал положительный результат с ДНК 25 изолятов *Salmonella enterica*. С наибольшей частотой сальмонеллы обнаруживаются в мясе птицы – 36%, рыбе – 4%, яйцах – 20%, молочной продукции – 12%, растительных салатах – 4%. В сыром мясе и колбасных изделиях сальмонеллы присутствовали в 24% проб. При типировании исследованных ДНК 25 изолятов, выделенных из цепи пищевых продуктов, было выявлено, что 14 изолятов (56%) относятся к бактерии *Salmonella enterica Typhimurium*, 8 изолятов – к бактерии *Salmonella enterica Enteritidis* (32%), 3 изолята – к бактерии *Salmonella enterica Virchow* (12%). Генетическое разнообразие изолятов бактерий *Salmonella* определено с использованием RAPD ПЦР. Для 3 типов бактерии *Salmonella enterica* был выявлен специфический набор ДНК-фрагментов, отличающих их друг от друга. Проведенный RAPD-ПЦР анализ геномной ДНК бактерий *Salmonella enterica* показал генетическое родство 8 изолятов *Salmonella enterica Enteritidis*, такие же результаты показали 3 изолята *Salmonella enterica Virchow*. Исследованные изоляты *Salmonella enterica Typhimurium* показали генетическую гетерогенность.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, бактериальные изоляты, праймер, продукты питания, *Salmonella*

**GENETIC POLYMORPHISM OF ISOLATES OF *SALMONELLA* BACTERIA
ISOLATED FROM FOODSTUFFS**

^{1,2}Barmak S.M., ²Sinyavsky Yu.A., ²Berdygaliev A.B., ²Sharmanov T.Sh.,

³Mendenkhall I.Kh., ⁴Zholdybaeva E.V.

¹Kazakh National University named after Al-Farabi, Almaty;

²Kazakh Academy of Nutrition, Almaty;

³Duke-NUS Medical School, Singapore;

⁴National Center for Biotechnology, Nur Sultan, e-mail: sabyr95@mail.ru

Molecular genetic identification of isolates of *Salmonella* bacteria isolated from foodstuffs was carried out. PCR analysis with a species-specific primer S Inv-1F and S Inv-1R showed a positive result with DNA 25 isolates of *Salmonella enterica*. With the highest frequency, salmonella is found in poultry meat – 36%, fish – 4%, eggs – 20%, dairy products – 12%, vegetable salads – 4%. *Salmonella* was present in 24% of the samples in raw meat and sausages. When typing the studied DNA of 25 isolates isolated from the food chain, it was revealed that 14 isolates (56%) belong to the bacteria *Salmonella enterica Typhimurium*, 8 isolates to the bacteria *Salmonella enterica Enteritidis* (32%), 3 isolates to the bacteria *Salmonella enterica Virchow* (12%). The genetic diversity of *Salmonella* bacterial isolates was determined using RAPD PCR. For the three types of bacteria *Salmonella enterica*, a specific set of DNA fragments was identified that distinguished them from each other. RAPD-PCR analysis of the genomic DNA of *Salmonella enterica* bacteria showed the genetic affinity of eight isolates of *Salmonella enterica Enteritidis*, the same results were shown for three isolates of *Salmonella enterica Virchow*. The studied isolates of *Salmonella enterica Typhimurium* showed genetic heterogeneity.

Keywords: genetic polymorphism, bacterial isolates, primer, foodstuffs, *Salmonella*

Пищевые сальмонеллезы – широко распространенные заболевания человека, их регистрируют во всех странах, на всех континентах [1]. Болезнь имеет эпизоотологическое, эпидемиологическое, экологическое и социально-экономическое значение и представляет серьезную потенциальную угрозу для людей [2]. Актуальность проблемы сальмонеллы связана с высоким уровнем заболеваемости и сохраняющейся

тенденцией к ее росту, трудностями в эпидемиологическом исследовании причин сальмонеллы, формированием устойчивости к противомикробным препаратам и отсутствием эффективной специфической профилактики. Быстрая диагностика сальмонеллы и методы типирования сальмонеллы являются наиболее важными моментами в подавлении распространения патогенных микроорганизмов [3].

По заключению Комитета экспертов ВОЗ, сальмонеллез не имеет себе равных по сложности диагностики, профилактики и лечения [4].

Пищевой сальмонеллез является широко распространенным заболеванием человека, регистрируется во всех странах, на всех континентах; сальмонеллы поражают человека и сохраняются в окружающей среде в течение длительного времени [5].

Большинство сальмонелл являются патогенными как для людей, так и для животных и птиц, но в эпидемиологическом отношении только несколько серотипов являются наиболее значимыми для людей, их доля составляет 85–91% сальмонелл во всем мире [6].

Возбудитель *Salmonella enterica* живет в основном в кишечнике, но, выделяясь с калом, он загрязняет почву и объекты окружающей среды, через которые он может передаваться восприимчивым животным и людям. Однако чаще заражение сальмонеллой происходит при непосредственном контакте с источником инфекции или при употреблении пищи, зараженной *Salmonella enterica*. Согласно существующей классификации [7] *Salmonella enterica* подразделяется на 6 подвидов: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* и *indica*, которые различаются по биохимической активности и обозначены номерами I, II, IIIa, IIIb, IV и VI соответственно. В подавляющем большинстве случаев сальмонеллезной инфекции от людей изолируют серовары подвида *enterica* [8].

Цель исследования: определение генетического полиморфизма изолятов бактерий *Salmonella*, выделенных из продуктов

питания, доступных потребителям на местных торговых точках.

Материалы и методы исследования

Бактериальные изоляты

25 изолятов сальмонеллы, использованных в этом исследовании, были получены из пищевых продуктов (табл. 1). Отбор проб для исследования проводили по ГОСТ 31904-2012 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний» [9].

В процессе работы применяли культуральные методы с использованием специальных селективных и дифференциально-диагностических сред. Культуральные, морфологические, и биохимические свойства выделенных микроорганизмов изучали общепринятыми методами и в соответствии с ГОСТ Р 52814-2007 (ИСО 6579:2002) «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*» [10] и ГОСТ Р 50455-92 «Мясо и мясные продукты. Обнаружение сальмонелл (арбитражный метод)» [11].

Выделение ДНК. Выделение ДНК из бактерий *Salmonella* проводили тризольным методом с использованием коммерческого реагента TRizol («Invitrogen», США) в соответствии с инструкцией производителя.

Олигонуклеотидные праймеры для выявления бактерии *Salmonella*

Определение вида и типа бактерии *Salmonella* осуществляли с помощью ПЦР анализа, используя специфические праймеры (табл. 2).

Таблица 1

Изоляты бактерии *Salmonella*, выделенные из пищевых продуктов в 2018 г.

| № | Рег. номер | Использованные продукты | № | Рег. номер | Использованные продукты |
|----|------------|--------------------------------------|----|------------|--------------------------------|
| 1 | 8 | Куриная печень | 14 | 67 | Сердце индейки |
| 2 | 9 | Яйца | 15 | 69 | Фарш говядина/курица |
| 3 | 24 | Фарш баранина/говядина | 16 | 70 | Яйцо промышленной птицефабрики |
| 4 | 26 | Голень индейки замороженная | 17 | 86 | Мороженое |
| 5 | 27 | Тушка цыпленка бройлера замороженная | 18 | 90 | Баранина |
| 6 | 31 | Желудок цыпленка | 19 | 70/1 | Яйцо промышленной птицефабрики |
| 7 | 34 | Яйца якорские | 20 | 96 | Рыба лещ |
| 8 | 37 | Яйца домашние | 21 | 120 | Сало свиное |
| 9 | 39 | Фарш куриный | 22 | 121 | Говядина |
| 10 | 40 | Голень куриная | 23 | 124 | Сосиски детские |
| 11 | 46 | Капуста цветная/салат | 24 | 125 | Сосиски говяжьи |
| 12 | 53 | Творог домашний | 25 | 126 | Брынза |
| 13 | 63 | Фарш куриный | | | |

Таблица 2

Праймеры, используемые для выявления вида и типа бактерии *Salmonella*

| № | Название праймера | Олигонуклеотиды | Размер ПЦР продукта, п.о. | Вид и тип бактерии <i>Salmonella</i> |
|---|-------------------|--------------------------|---------------------------|--|
| 1 | SInv-1F | GTGAAATTATCGCCACGTTCCGG | 500 | <i>Salmonella enterica</i> |
| | SInv-1R | ATCGCCATTACGCGGGTCA | | |
| 2 | SE Prot6e-1F | TAACCGGAGAGGCGCTCATC | 300 | <i>Salmonella enterica</i> <i>Enteritidis</i> |
| | SE Prot6e-1R | AACCATGCTCAGCTGCTCCA | | |
| 3 | ST mdh-1F | TGCCGCTGCTGTGCGAGATT | 200 | <i>Salmonella enterica</i> <i>Typhimurium</i> |
| | ST mdh-1R | CACCACGCCCTTCTCGCCCT | | |
| 4 | SVCRISPR-1F | AGCCGCAGGATGTGCTGGAA | 400 | <i>Salmonella enterica</i> Virchow |
| | SVCRISPR-1R | GATAAACCGCCGCGCCTTAT | | |
| 5 | hgbAa (RAPD ПЦР) | GCG GGAATG CTG AAG ATAAG | – | <i>Salmonella enterica</i> |

Постановка ПЦР для идентификации сальмонелл. Получение ПЦР-фрагмента гена Inv бактерии *Salmonella enterica* проводили с использованием праймеров: S Inv-1F и S Inv-1R (размер ПЦР продукта 500 п.о.). Следующие праймеры использованы для типизации: для типа *Enteritidis* бактерии *Salmonella enterica* – SE Prot6e-1F и SE Prot6e-1R (размер ПЦР продукта 300 п.о.); для типа *Typhimurium* бактерии *Salmonella enterica* – ST mdh-1F и ST mdh-1R (размер ПЦР продукта 200 п.о.); для типа Virchow бактерии *Salmonella enterica* – SV CRISPR-1F и SV CRISPR-1R (размер ПЦР продукта 400 п.о.).

Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 10xбуфер ДНК полимеразы – 2,5 мкл, 10 mM dNTP – 1 мкл, MgCl₂ – 1 мкл, 20-50 нг ДНК-матрицы, по 20 пмоль прямого и обратного праймеров и 0,5 ед. TaqДНК полимеразы (Invitrogen). Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий (1 мкг/мл), при напряженности поля 6 В/см².

Постановка RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) ПЦР

Для постановки RAPD ПЦР используют праймер: hgbAa –GCG GGA ATG CTG AAG ATA AG. Реакционный состав: 10x буфер – 2,5 мкл; dNTPs – 1 мкл; MgCl₂ – 1 мкл; праймер – 2 мкл; 0,5 ед. TaqДНК полимеразы – 0,5 мкл; ДНК – 5 мкл; вода – до 25 мкл. Температурный режим амплификации: 94 °C – 5 мин; 40 циклов 94 °C – 45 сек, 35 °C – 5 сек, 72 °C – 1,20 мин; 72 °C – 10 мин.

Результаты исследования и их обсуждение

Осуществлено исследование 25 образцов пищевых продуктов на содержание

в них бактерий *Salmonella*. Проведен ПЦР анализ с использованием видоспецифичных праймеров SInv-1F и SInv-1R для определения вида *enterica* бактерии *Salmonella*. Для типирования бактерии *Salmonella* вида *enterica* с помощью ПЦР-анализа использованы олигонуклеотидные праймеры: 1) для типа *Enteritidis* бактерии *Salmonella enterica* – SE Prot6e-1F и SE Prot6e-1R; 2) для типа *Typhimurium* бактерии *Salmonella enterica* – ST mdh-1F и ST mdh-1R; 3) для типа Virchow бактерии *Salmonella enterica* – SV CRISPR-1F и SV CRISPR-1R.

При типировании исследованных ДНК 25 изолятов, выделенных из цепи пищевых продуктов, было выявлено: 14 изолятов (56%) бактерии *Salmonella enterica* *Typhimurium*, 8 изолятов бактерии *Salmonella enterica* *Enteritidis* (32%), 3 изолята бактерии *Salmonella enterica* Virchow (12%).

С наибольшей частотой сальмонеллы обнаруживаются в мясе птицы – 36%, рыбе – 4%, яйцах – 20%, молочной продукции – 12%, растительных салатах – 4%. В сыром мясе и колбасных изделиях сальмонеллы присутствовали в 24% проб.

Генетический полиморфизм изолятов бактерии *Salmonella enterica*, полученных из цепи пищевых продуктов

Для выявления генетического разнообразия изолятов *Salmonella enterica* *Enteritidis*, *Salmonella enterica* *Typhimurium* и *Salmonella enterica* Virchow проведен ПЦР анализ с использованием RAPD-праймера.

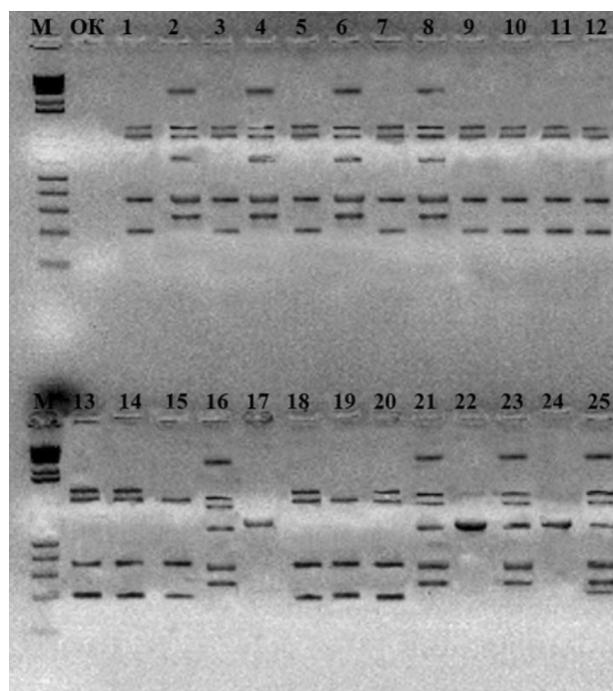
Результаты выявления генетического разнообразия исследуемых изолятов *Salmonella enterica* *Enteritidis*, *Salmonella enterica* *Typhimurium* и *Salmonella enterica* Virchow, полученных из цепи пищевых продуктов, представлены в табл. 3 и на рисунке.

При помощи данного RAPD-праймера был получен одинаковый специфический набор ДНК-фрагментов бактерии *Salmo-*

nella enterica Enteritidis, не отличающих их друг от друга. Показано, что для этих изолятов было выявлено по 6 ампликонов длиной 250, 350, 650, 1000, 1250, 3000 п.о., что говорит об их генетическом родстве.

При генотипировании изолятов *Salmonella enterica Typhimurium* под номерами 1,3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19 и 20 (1-я группа) было выявлено 4 ампликона (200, 350, 1000, 1250 п.н.), а для

изолятов *Salmonella enterica Typhimurium* под номерами 15 и 19 (2-я группа) были получены по 3 ампликона (200, 350, 1000 п.н.). В результате амплификации геномной ДНК изолятов RAPD-праймером был получен специфический набор ДНК-фрагментов, отличающих их друг от друга. Изоляты 1-й группы генетически отличаются от изолятов 2-й группы бактерии *Salmonella enterica Typhimurium*.



Электрофореграмма разделения ПЦР продуктов изолятов *Salmonella enterica*, полученных из цепи пищевых продуктов с использованием RAPD-праймера

Таблица 3

Характеристики изолятов бактерии *Salmonella*, выявленных из цепи производства пищевых продуктов методами ПЦР и RAPD ПЦР

| № | Рег. номер штамма | Использованные продукты | Вид бактерии <i>Salmonella</i> | Тип <i>Salmonella enterica</i> | Размеры ампликонов в RAPD ПЦР, п.о. |
|----|-------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 8 | Куриная печень | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000, 1250 |
| 2 | 9 | Яйца | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Enteritidis</i> | 250, 350, 650, 1000, 1250, 3000 |
| 3 | 24 | Фарш баранина | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000, 1250 |
| 4 | 26 | Голень индейки | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Enteritidis</i> | 250, 350, 650, 1000, 1250, 3000 |
| 5 | 27 | Тушка цыпленка бройлера | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000, 1250 |
| 6 | 31 | Желудок цыпленка | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Enteritidis</i> | 250, 350, 650, 1000, 1250, 3000 |
| 7 | 34 | Яйца якорские | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000, 1250 |
| 8 | 37 | Яйца домашние | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Enteritidis</i> | 250, 350, 650, 1000, 1250, 3000 |
| 9 | 39 | Фарш куриный | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000, 1250 |
| 10 | 40 | Голень куриная | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000, 1250 |
| 11 | 46 | Капуста цветная | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000 |
| 12 | 53 | Творог домашний | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000, 1250 |
| 13 | 63 | Фарш куриный | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000 |

Окончание табл. 3

| № | Рег. номер штамма | Использованные продукты | Вид бактерии <i>Salmonella</i> | Тип <i>Salmonella enterica</i> | Размеры ампликонов в RAPD ПЦР, п.о. |
|----|-------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| 14 | 67 | Сердце индейки | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000, 1250 |
| 15 | 69 | Фарш курица | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000, 1250 |
| 16 | 70 | Яйцо птицефабрики | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Enteritidis</i> | 250, 350, 650, 1000, 1250, 3000 |
| 17 | 86 | Мороженое | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Virchow</i> | 200, 650, 1200 |
| 18 | 90 | Баранина | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000, 1250 |
| 19 | 70/1 | Яйцо птицефабрики | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000, 1250 |
| 20 | 96 | Рыба лещ | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Typhimurium</i> | 250, 350, 1000, 1250 |
| 21 | 120 | Сало свиное | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Enteritidis</i> | 250, 350, 650, 1000, 1250, 3000 |
| 22 | 121 | Говядина | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Virchow</i> | 200, 650, 1200 |
| 23 | 124 | Сосиски детские | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Enteritidis</i> | 250, 350, 650, 1000, 1250, 3000 |
| 24 | 125 | Сосиски говяжьи | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Virchow</i> | 200, 650, 1200 |
| 25 | 126 | Брынза | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Enteritidis</i> | 250, 350, 650, 1000, 1250, 3000 |

В изолятах *Salmonella enterica Virchow* были выявлены по 3 ампликона длиной 200, 650, 1200 п.о. Эти данные являются показателями их генетического родства.

Существуют генетические различия между штаммами возбудителей различных заболеваний. При накоплении достаточного количества мутаций в штаммах методы генотипирования начинают различать изоляты. В некоторых случаях изоляты не отличаются распределением фрагментов ДНК, что указывает на генетическую близость этих изолятов. В таких случаях они являются генетически идентичными или отличаются друг от друга на уровне только одного или нескольких генов, полиморфизм которых ускользает от скрининга [12].

Обнаружение различных типов изолятов *Salmonella enterica*, циркулирующих на территории Республики Казахстан, указывает на необходимость проведения более углубленных генетических исследований.

Выводы

При типировании изолятов *Salmonella enterica*, полученных из цепи пищевых продуктов, выявлено 14 изолятов (56%) бактерии *Salmonella enterica Typhimurium*, 8 изолятов бактерии *Salmonella enterica Enteritidis* (32%), 3 изолята бактерии *Salmonella enterica Virchow* (12%).

Проведен молекулярный анализ с использованием RAPD ПЦР для выявления генетического разнообразия изолятов бактерий *Salmonella enterica*, полученных из цепи пищевых продуктов. В RAPD ПЦР 8 изолятов *Salmonella enterica Enteritidis* показали генетическое родство с одинаковым количеством ампликонов (50, 350, 650, 1000, 1250, 3000 п.о.). Близкое генетическое родство выявлено у 3 изолятов *Salmonella enterica Virchow* (200, 650, 1200 п.о.) В изолятах *Salmonella enterica Typhimurium*, вы-

деленных из цепи пищевых продуктов, обнаружены две генетически отличающиеся группы с разным набором ДНК-фрагментов.

Список литературы

1. Чугунова Е.О., Татарникова Н.А. Сальмонеллез сельскохозяйственных животных и птиц: характеристика возбудителя, распространенность в пермском крае и эпидемиологическое значение: учебное пособие. Пермь: Прокрость, 2014. 63 с.
2. Тимофеева М.А., Ларина О.Н., Шкиль Н.А. Биологические свойства и чувствительность к антибиотикам бактерий рода *Salmonella*, изолированных из продукции птицеводства // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). 2019. № 3. С. 112–119. DOI: 10.31677/2072-6724-2019-52-3-112-119.
3. Слизень В.В., Гудкова Е.И., Скороход Г.А. Разработка метода пцр для экспрессидентификации *Salmonella spp.* и среди них *Salmonella enteritidis* // Инновации в медицине: сборник научных трудов. Минск: БГМУ, 2012. 6 с.
4. Рождественская Т.Н., Яковлев С.С., Кононенко Е.В. Профилактика сальмонеллеза птиц // Farm Animals. 2012. № 1 (1). С. 54–56.
5. Lal A., Hales S., French N., Baker M.G. Seasonality in Human Zoonotic Enteric Diseases: A Systematic Review. PLoS ONE. 2012. V. 7(4). P. e31883. DOI: 10.1371/journal.pone.0031883.
6. Simpson K.M.J., Hill-Cawthorne G.A., Ward M.P., Diversity of *Salmonella* serotypes from humans, food, domestic animals and wildlife in New South Wales, Australia. BMC Infect. 2018. V. 623. DOI: 10.1186/s12879-018-3563-1.
7. Mukherjee N., Nolan V.G., Dunn J.R., Banerjee P. Sources of human infection by *Salmonella enterica* serotype Javiana: A systematic review. PLoS ONE. 2019. V. 14(9). P. e0222108. DOI: 10.1371/journal.pone.0222108.
8. Шуляк Б.Ф. Традиционные и новые подходы к лабораторной диагностике сальмонеллеза // Справочник заведующего КДЛ. 2009. № 12. С. 21–26.
9. Межгосударственный стандарт ГОСТ 31904-2012. Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний. М.: Стандартинформ, 2014. 10 с.
10. ГОСТ Р 52814-2007 (ИСО 6579:2002). Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*. М.: Стандартинформ, 2010. 22 с.
11. ГОСТ Р 50455-92. Мясо и мясные продукты. Обнаружение сальмонелл (арбитражный метод). М.: Стандартинформ, 2010. 14 с.
12. Терлецкий В.П., Усенбеков Е.С., Жансеркенова О.О. Генотипирование штаммов микроорганизмов методом ДРИМ (двойное расщепление и избирательное мечение) // Исследования, результаты. 2016. № 3(71). С. 86–91.