

ГЛАВА 3.9.8.

САЛЬМОНЕЛЛЕЗ*¹

РЕЗЮМЕ

Определение заболевания: Сальмонеллез представляет собой инфекционное заболевание человека и животных, вызванное бактериями рода *Salmonella*. Сальмонеллы являются причинным фактором диарейных и системных инфекций. Сальмонеллы часто вызывают субклинические инфекции, но в больших количествах могут выделяться с фекалиями в клинических случаях и у животных носителей, приводя к загрязнению окружающей среды. Инфекция у сельскохозяйственных (мясо-молочных) животных часто приводит к контаминации мяса, яиц, молока и сыра. Сальмонеллез является одним из наиболее распространенных и экономически важных зоонозных заболеваний пищевого происхождения у человека. Это заболевание было распознано во всех странах, а нетифоидная *Salmonella*, по-видимому, наиболее распространена в областях интенсивного животноводства, особенно среди свиней, интенсивно разводимых телят и домашней птицы.

Заболевание может поражать все виды домашних животных, но наиболее восприимчивы молодые животные, а также беременные и кормящие самки. Самые частые клинические проявления связаны с кишечным расстройством, но может наблюдаться самый широкий спектр клинических признаков, включая острую септицемию, аборт, артрит и респираторные нарушения. Многие животные, особенно свиньи и домашняя птица, могут быть заражены, не проявляя при этом клинических признаков заболевания. Такие животные могут стать важным источником распространения инфекции в группах крупного и мелкого скота, а также источником контаминации пищи и инфицирования человека.

Птичий тиф и пуллороз, болезни домашней птицы, вызванные видоспецифической по отношению к хозяину *Salmonella*, рассматриваются в главе 2.3.11 данного Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных.

Идентификация возбудителя болезни: Диагноз основан на выделении микроорганизма либо из образцов тканей, асептически собранных при некропсии, либо из фекалий, ректальных мазков или образцов материала из окружающей среды, продуктов питания и кормов. Прошедшую или текущую инфекцию у животных, вызванную некоторыми сероварами, также можно диагностировать серологически. При инфекции репродуктивных органов или аборте необходимо культивировать содержимое желудка плода, ткань плаценты и вагинальные мазки, а в случае домашней птицы, яйца с развивающимся эмбрионом.

Сальмонелл можно выделять, используя множество методик, в том числе, предварительное обогащение для восстановления и размножения сублетально поврежденных сальмонелл, использование обогащающих сред, которые содержат ингибирующие вещества для подавления роста конкурирующих микроорганизмов, и селективных плоских агаров для дифференциации сальмонелл от других энтеробактерий. В соответствии с законодательными требованиями также можно использовать такие альтернативные методы, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и иммунологическое обнаружение антигенов *Salmonella*.

¹ Хотя некоторые болезни, вызванные бактериями рода *Salmonella*, включены в разделы списка МЭБ по описанию отдельных видов, данный раздел охватывает несколько видов и, таким образом, дает более широкое описание.

Для окончательного подтверждения выделенного штамма чистую культуру можно анализировать различными биохимическими, серологическими и молекулярными методами. Сальмонеллы обладают антигенами под названиями соматический (O), жгутиковый (H) и вирулентный (Vi), которые могут быть распознаны специфическими титрующими сыворотками, а серовар можно определить по антигенной формуле в схеме White-Kauffmann-Le Minor. Многие лаборатории, возможно, нуждаются в пересылке выделенного бактериального материала в референтную лабораторию. Все более и более широко используются альтернативные методы серотипирования, включая мультилокусное секвенирование (MLС) на основе полногеномного секвенирования. Для некоторых сероваров также доступны схемы фаготипирования.

Серологические реакции: Серологические реакции необходимо проводить на статистически репрезентативной популяционной выборке, но результаты не всегда четко указывают на активную инфекцию. Методом выбора при лабораторном анализе образцов от всех видов сельскохозяйственных животных в целях экспорта и диагностики является реакция агглютинации в пробирке. Для некоторых сероваров доступен твердофазный иммуноферментный анализ, который можно использовать для серологической диагностики и наблюдения, особенно для домашней птицы и свиней. Вакцинация от сальмонеллеза может поставить под сомнение диагностическую ценность серологических анализов.

Требования к вакцинам: В продажу поступают инактивированные и живые вакцины. Для повышения эффективности инактивированных вакцин в их состав вводят нефтяные адъюванты или гидрат окиси алюминия.

А. ВВЕДЕНИЕ

Сальмонеллез – это инфекционное заболевание человека и животных, которое клинически характеризуется септициемией, острым энтеритом или хроническим энтеритом. Животные могут быть инфицированными, не проявляя заметных клинических признаков инфекции. Сальмонеллы, прежде всего, являются кишечными бактериями и могут непрерывно или периодически выбрасываться с фекалиями, приводя к загрязнению окружающей среды.

1. Причинный патогенный фактор

Род *Salmonella* состоит только из двух видов: *S. enterica* и *S. bongori* (Grimont & Weill, 2007). Вид *Salmonella enterica* разделен на шесть подвидов, которые различаются по определенным биохимическим характеристикам и чувствительности к лизису бактериофагом Felix O1. Эти подвиды перечислены ниже:

Истинные подвиды		Современная номенклатура
• подвид I	=	подвид <i>enterica</i>
• подвид II	=	подвид <i>salamae</i>
• подвид IIIa	=	подвид <i>arizonae</i>
• подвид IIIb	=	подвид <i>diarizonae</i>
• подвид IV	=	подвид <i>houtenae</i>
• подвид VI	=	подвид <i>indica</i>

Для сероваров *S. bongori* был сохранен символ V во избежание путаницы с названиями сероваров *S. enterica* подвид *enterica*.

Штаммы *Salmonella* сгруппированы в серовары на основе большого разнообразия липополисахаридов (ЛПС) или антигенов O и жгутикового белка или антигенов H в

соответствии со схемой White-Kauffmann-Le Minor. В настоящее время распознано более 2600 сероваров (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014). Наиболее распространенные серовары, вызывающие инфекции у человека и сельскохозяйственных животных, принадлежат к подвиду *enterica*. Серовары другого подвида чаще обнаруживают у холоднокровных животных и в окружающей среде, но в редких случаях они вызывают заболевание у человека. Одни серовары подвида *arizonae* и подвида *diarizonae* могут вызывать заболевание у индюков и овец, а другие могут инфицировать рептилий и амфибий, которые выступают в роли носителей. В соответствии со схемой White-Kauffmann-Le Minor только сероварам подвида *enterica* присвоены имена, например, *S. enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis*, или *S. enterica* серовар *Enteritidis*, или вкратце *S. Enteritidis*. Серовары другого подвида *S. enterica* и серовары *S. bongori* обозначают только их антигенной формулой (например, *Salmonella* IV 48:g.z51).

Возможные изменения классификации сероваров связаны с экспрессией разных антигенов О вследствие вариабельности формы колоний или лизогении бактериофагом (бактериофагами), или выработки разных жгутиков в результате фазовой вариации.

2. Описание заболевания

Течение инфекции, клинические признаки, посмертные находки и эпидемиологические проявления варьируются в зависимости от сероваров и пораженных видов животных. Большинство сероваров могут вызывать заболевание у животных в самом широком спектре видов (Barrow & Methner, 2013), но некоторые серовары видоспецифичны по отношению к хозяину, например, *S. Typhi* у человека и *S. Abortusovis* у овец. Другие серовары адаптированы к хозяину, например, *S. Choleraesuis* у свиней и *S. Dublin* у крупного рогатого скота. Специфичные в отношении хозяина и адаптированные к хозяину серовары часто вызывают септицемическое заболевание. У домашней птицы специфичные для хозяина заболевания (пуллороз или белая бациллярная диарея и птичий тиф) используются для описания инфекции, вызванной *S. Pullorum* и *S. Gallinarum*, соответственно (Barrow & Neto, 2011). Птичий тиф и пуллороз подробно описаны в главе 2.3.11 данного Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных.

У человека наиболее восприимчивы к сальмонеллезу дети младшего возраста, пожилые люди и лица с ослабленным иммунитетом. Заболевание может поражать все виды домашних животных, но наиболее восприимчивы молодые животные и беременные самки. Широкий спектр клинических признаков сальмонеллеза включает острый сепсис, острую или хроническую диарею, респираторные нарушения, аборт и артрит. Цыплята и птенцы в возрасте менее 1 недели очень восприимчивы к инфекции *Salmonella* и иногда могут демонстрировать такие признаки как анорексия, адипсия, депрессия, сильное раздражение, скучивание в группы, сонливость, обезвоживание, белая диарея и слипшиеся выходные отверстия, что в результате приводит к значительной смертности. Однако даже у молодой поросли домашней птицы наиболее вероятно субклиническая инфекция. У телят септицемическая инфекция адаптированным к хозяину сероваром *S. Dublin* развивается, главным образом, в возрасте 2–6 недель. Больные телята вялы, лихорадят, проявляют анорексию, диарею с кровью и слизью в фекалиях, у них может развиваться пневмония, и часто развивается быстрое обезвоживание, приводящее к смерти, если не было своевременно начато соответствующее лечение. У беременных коров инфекция *S. Dublin* часто приводит к аборту. У свиней, инфицированных адаптированным к хозяину видом *S. Choleraesuis*, может развиваться клиническое заболевание с анорексией, высокой температурой, летаргией и возможным цианозом конечностей.

Многие животные, особенно домашняя птица и свиньи, могут быть инфицированы, не проявляя при этом клинических признаков заболевания (Barrow & Methner, 2013). Такие

животные могут быть важным источником распространения инфекции среди овец и рогатого скота. Сальмонеллез был распознан во всех странах, но нетифоидная инфекция, по-видимому, наиболее распространена в зонах интенсивного животноводства, особенно разведения домашней птицы или свиней (Barrow & Methner, 2013).

3. Зоонозный риск и требования по биологической безопасности

Сальмонеллез человека – это одно из наиболее распространенных и экономически важных зоонозных заболеваний. Центры контроля и профилактики заболеваний (CDC) оценивают ежегодную заболеваемость сальмонеллезом в США на уровне более 1,2 миллионов случаев, с последующей госпитализацией более чем в 23 000 случаев и 450 смертельными исходами (CDC, 2013). Наиболее частая причина инфицирования бактериями *Salmonella* заключается в употреблении загрязненных пищевых продуктов, включая сырые или сыроватые яйца или яичные продукты, мясо, домашнюю птицу, контаминированные свежие фрукты и овощи и мягкие сыры, изготовленные из непастеризованного молока.

Salmonella также может распространяться на человека через контакты с инфицированными птицами, домашним скотом, рептилиями, амфибиями, а также собаками и кошками. Эти животные могут быть носителями бактерий даже в предположительно здоровом состоянии. Было показано, что многие серовары, включая адаптированные к хозяину, такие как *S. Choleraesuis* и *S. Dublin*, способны вызывать тяжелое заболевание у человека. Рабочие скотобоен, обслуживающий персонал по уходу за животными и ветеринары могут быть инфицированы непосредственно в ходе своей работы, вступая в контакт с зараженными животными. Лабораторный персонал также может получить инфекцию, пренебрегая правилами безопасности. Для предотвращения случаев лабораторных инфекций при ветеринарной диагностике и в вивариях необходимо соблюдать меры биологической безопасности и биозащиты (см. главу 1.1.4 *Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных*).

4. Дифференциальная диагностика

У молодых птиц с генерализованным сальмонеллезом признаки заболевания очень напоминают пуллороз, птичий тиф и другие острые болезни с септицемией, которые могут быть вызваны многими разнообразными бактериями включая *Escherichia coli*. У всех видов птиц артрит, вызванный инфекцией *Salmonella*, можно принять за синовит или бурсит, вызванный другими инфекциями. Септицемический сальмонеллез у свиней, вызванный *S. Choleraesuis*, можно ошибочно принять за холеру свиней. Септицемический сальмонеллез у телят можно перепутать с колисепсисом, хотя последний обычно наблюдается в младшем возрасте. Острая кишечная форма сальмонеллеза у телят может напоминать кокцидиоз. Аборты у овец могут быть вызваны не только *S. abortusovis*, но и *Coxiella burnetii*, *Chlamydophila abortus*, *Brucella ovis* или другими патогенными микроорганизмами.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследований, доступные для диагностики сальмонеллеза и их назначение

Метод	Цель					
	Отсутстви е инфекции в популяци и	Отсутстви е инфекции у отдельных животных перед перемещени е	Вклад в политику искоренени я	Подтверждени е клинических случаев	Надзор за распространени е м инфекции	Иммунны й статус у отдельных животных или популяций после

						вакцинаци и
Идентификация возбудителя²						
Выделение <i>Salmonella</i>	+++	+++	+++	+++	+++	нп
Быстрые альтернативны е методы, например, ПЦР	+	+	+	+	+	нп
Выявление иммунной реакции						
РСА	++	-	++	-	+	++
Твердофазный ИФА	++	-	+++	+	++	++

Пояснение: +++ = рекомендованный метод; ++ = приемлемый метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но применение существенно ограничено стоимостью, достоверностью или другими факторами; – = не подходит для данной цели; нп = не применимо.

Хотя не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++ формально валидированы, они признаны приемлемыми по причине применения их в установившейся практике и широкого использования без неоднозначных результатов.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; РСА = реакция сывороточной агглютинации; твердофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ.

1. Идентификация возбудителя

Частота отбора проб и тип полученных образцов будут в значительной степени зависеть от целей программы тестирования, правил импорта и экспорта, клинических данных, требований к уровню обнаружения или к точности оценок распространенности, стоимости и доступности ресурсов для сбора материала, а также лабораторных мощностей. Общие рекомендации по принципам сбора, представления и хранения образцов для диагностики или мониторинга, по размерам выборки, по информации, сопровождающей образцы, а также по упаковке и транспортировке образцов описаны в главах 1.1.2 и 1.1.3 данного Руководства МЭБ по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных.

Индивидуальные образцы для бактериологических анализов необходимо собирать при максимально возможном соблюдении правил асептики, а в случае клинической болезни или стандартного мониторинга образцы должны быть собраны до начала любого применения антибиотиков. Клинические образцы предпочтительно собирать в острой фазе болезни или, по возможности, вскоре после смерти. Самым рентабельным способом для выявления массового заражения в стаях домашней птицы или других видов птиц может быть исследование образцов из окружающей среды, например, естественных скоплений помета, мусора и пыли, соскобов или мазков с поверхности пола (Carrique-Mas & Davies, 2008). Для мелких животных предпочтительно представить в лабораторию репрезентативный в количественном отношении материал, т.е., достаточное число больных или недавно умерших животных (ВОЗ, 1994). Адаптированные к хозяину серовары с трудом поддаются выделению из фекалий, поэтому при таком подозрении следует, по возможности, культивировать инфицированные ткани.

Особенно внимательно надо относиться к выделению сальмонеллы из материала, полученного от животных с субклинической инфекцией, поскольку такие животные выделяют бактерии лишь периодически и в небольшом количестве. Большую диагностическую чувствительность могут обеспечить увеличенный размер выборки,

² Рекомендуется комбинация методов идентификации возбудителя при анализе одного и того же клинического образца.

большее количество образцов от большего числа индивидуальных особей, которые иногда объединяют и собирают повторно. Поскольку бактерии обычно образуют скопления в фекалиях, чувствительность процедуры также можно увеличить за счет тщательного перемешивания образца перед культивированием (Cannon & Nicholls, 2002). Для определения массового заражения в стадах животных или стаях птиц, скорее надо применять бактериологические и серологические методы вместо индивидуального выявления зараженных животных.

1.1. Культура

Существуют многочисленные методы для выделения и обнаружения *Salmonella*, которые широко используются во всем мире (Fricker, 1987; Harvey & Price, 1974; Lee *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2014; Reissbrodt, 1995). Некоторые из общепринятых методик описаны ниже. Методики культивирования и питательные среды, которые способны лучшим образом работать в конкретной диагностической ситуации, зависят от множества факторов, включая серовар *Salmonella*, источник получения и тип образцов, вид животных, от которых исходит инфекция, опыт микробиолога и доступность селективных сред для обогащения культур и выделения искомым бактерий.

Все приготовленные культуральные среды должны проходить контроль качества и обеспечивать рост подозрительного микроорганизма из небольшого количества посевного материала в присутствии релевантной матрицы проб. Рутинное использование эталонного штамма параллельно с обычными образцами при небрежных методиках может привести к перекрестной контаминации образцов. Поэтому следует использовать редкий серовар с типичными характеристиками роста, который сходен с наиболее приоритетными целевыми штаммами. Кроме того, можно использовать штаммы с резистентностью к противомикробным препаратам или с другими маркерами, например, с флюоресценцией.

Растущее применение внешних программ гарантии качества привело к большему методическому использованию международных стандартов, таких как ISO 6579:2002, даже при том условии, что этот метод не был аттестован для образцов фекалий и материала из окружающей среды, а был предназначен для продуктов питания и кормов для животных (ISO, 2002). Был опубликован стандартный метод для выявления *Salmonella* в первичной продукции животноводства, и настоящее время принят метод ISO (ISO, 2007). Основу для стандартного метода составляет предварительное обогащение в забуференной пептонной воде с последующим обогащением на модифицированной полутвердой среде Раппопорта-Вассилиадиса (MSRV) и выделением на ксилозо-лизиновом агаре с дезоксихолатом (XLD) и дополнительной наиболее эффективной плоской чашечной среде. Также было показано, что этот метод очень эффективен для исследования животных кормов, образцов окружающей среды для животных и мясных продуктов, причем он проще и дешевле, чем полный метод ISO. Диагностические методы и анализы должны быть аттестованы, как это описано в главе 1.1.6 *Принципы и методы валидации диагностических наборов для анализа инфекционных заболеваний*.

1.1.1. Среда для предварительного обогащения

Количество сальмонелл в фекалиях от бессимптомных животных, в образцах из окружающей среды, в кормах для животных и в пищевых продуктах обычно невелико, что нередко заставляет использовать специальные среды для предварительного обогащения (например, буферизованную пептонную воду), чтобы облегчить выделение нужного штамма. Это позволяет размножиться небольшому количеству сальмонелл, которые в противном случае погибли бы из-за токсического эффекта селективной питательной среды, и помогает восстановить сублетально поврежденные сальмонеллы, например, в результате замораживания, нагревания, высыхания, а также воздействия

антисептиков или органических кислот (Harvey & Price, 1974). Для тех животных, которые лишь периодически выбрасывают сальмонеллы с фекалиями, целесообразно анализировать, по меньшей мере, три последовательных образца фекалий.

1.1.2. Селективные обогащающие среды

Обогащающие среды представляют собой жидкие или полутвердые агары, содержащие добавки, которые избирательно позволяют размножаться сальмонеллам, но подавляют рост других бактерий. Примерами селективных обогащающих сред являются тетратионат в бульоне Мюллера-Кауфмана, селенит-цистеиновый бульон, бульон с бриллиантовым зеленым, бульон Раппопорта-Вассилиадиса и модифицированный полутвердый агар Раппопорта-Вассилиадиса (MRSV). Однако некоторые добавки также относительно токсичны по отношению к определенным сероварам *Salmonella*, например, селенит подавляет *S. Choleraesuis*, а бриллиантовый зеленый токсичен для многих штаммов *S. Dublin*. Для увеличения селективности также была использована повышенная температура, например, 43°C в некоторых лабораториях, хотя это воздействие может быть ингибирующим в комбинации с некоторыми средами, например, содержащими тетратионат. В средах Раппопорта-Вассилиадиса при 43°C подавляется рост термочувствительных штаммов, особенно *S. Dublin*, поэтому в настоящее время для инкубации в средах на основе бульона Раппопорта-Вассилиадиса рекомендуется температура 41,5°C. Для того чтобы увеличить чувствительность процедуры выделения *Salmonella* обычно используют селективные обогащающие среды для определения подвижности, такие как MSR/V или диагностическая полутвердая среда для *Salmonella* (DIASALM) (Voogt *et al.*, 2001). Рекомендуется использовать, по меньшей мере, два обогащающих бульона, причем один инкубируют при 37°C, а другой более высокой подходящей температуре. Рецептурный состав среды, который может изменяться в зависимости от поставщика, а в некоторых случаях даже в разных партиях, температура и продолжительность инкубации, а также объем образцов, используемых для засева среды, могут повлиять на эффективность выделения, следовательно, эти переменные всегда необходимо принимать во внимание. Для лучшего выделения *Salmonella* из образцов с ограниченным содержанием железа или питательных веществ, например, из яиц, воды или почвы, можно добавлять к селективным средам такие аддитивные компоненты как ферриоксамин Е (Reissbrodt, 1995), кроме того, для подавления роста большинства грамположительных микроорганизмов или других грамотрицательных бактерий, например, *Proteus*, можно добавлять такие антибиотики, как новобиоцин. Для лучшего выделения штаммов *Salmonella*, обладающих резистентностью к антибактериальным средствам, можно добавлять специфические антибиотики.

1.1.3. Селективные плоские среды

Эти среды представляют собой твердые селективные агары, в различной степени создающие условия для дифференциального роста. Они подавляют рост других бактерий кроме *Salmonella* и дают информацию о некоторых из основных дифференциальных биохимических характеристик: обычно о нелактозном сбраживании и выработке сероводорода (H₂S). Результаты считывают через 24 и 48 часов культивирования при 37°C. На таких средах сальмонеллы образуют характерные колонии, которые, как правило, отличимы от колоний других бактерий на плоской среде за возможными исключениями *Proteus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* и *Hafnia*. Иногда можно выделить сальмонеллы, ферментирующие лактозу, а выработка H₂S может варьироваться. Эффективное обнаружение таких атипичных штаммов возможно при использовании полутвердых сред, позволяющих определить подвижность. В качестве примера можно привести модифицированные полутвердые среды MSR/V и DIASALM. Селективность этих сред основана на подвижности микроорганизма, присутствии красителя «малахитовый зеленый» и новобиоцина, а также на высокой концентрации хлористого магния. Полутвердая среда позволяет обнаружить подвижность по наличию ростового

гало на далеком расстоянии от места посева. Среда DIASALM особенно полезна для выявления атипичных штаммов, поскольку можно получить предположительное подтверждение посредством реакции агглютинации на предметном стекле с использованием поливалентного О, Н, или специфических антисывороток на жидкости из зоны роста на агаре. Кроме того, можно использовать такие плоские среды как цитратный агар с дезоксихолом натрия (DCA), агар с бриллиантовым зеленым (BGA) или висмут-сульфитный агар, но эти среды чаще дают рост ложноположительных колоний. *Salmonella Abortusovis* – это медленно растущий серовар, и обычно чашки с посеянным материалом инкубируют до 72 часов, используя неселективный кровяной агар. Примерами селективных плоских сред являются BGA, агар XLD, DCA и висмут-сульфитный агар. В настоящее время доступен широкий спектр хромогенных агаров типа агара Рамбах (Rambach®) и среды SMID (агар для выявления и идентификации *Salmonella*). Многие из них могут помочь в дифференциации подозрительных колоний, но они должны быть аттестованы для матриц проб, систем культивирования и целевого диапазона сероваров, поскольку в некоторых ситуациях их чувствительность может оказаться плохой. Однако некоторые хромогенные агаровые среды, такие как Brilliance или Rapid, могут быть более эффективными для обнаружения биохимически атипичных сальмонелл.

1.1.4. Типовые методики для выделения бактерий *Salmonella* из пищи, кормов, фекальных и внешнесредовых образцов

- i) 10–25 граммов образца добавляют к $\times 10$ объему забуференной пептонной воды при комнатной температуре. (NB: для многих адаптированных к хозяину сероваров и некоторых сероваров *arizonae*, предпочтительно добавлять образец к селективной обогащающей среде, такой как селенит-цистеиновый бульон, и, по возможности, анализировать тканевые образцы [включая прямой посев в чашки]; см. метод культивирования для *S. Pullorum/Gallinarum* в главе 2.3.11 *Птичий тиф и пуллороз*).
- ii) Забуференную пептонную воду в инкубируют в течение 16–20 часов при 37°C.
- iii) 20 мл среды MSR/V или DIASALM в чашке Петри засевают 0,1 мл инкубированной забуференной пептонной воды.
- iv) 10 мл, бульона Мюллера-Кауфмана с тетрационатом засевают 1 мл бульона с инкубированной забуференной пептонной водой.
- v) Среду MSR/V or DIASALM инкубируют при 41,5°C, а бульон с тетрационатом при 37°C (убедитесь в том, что Вы используете бренд тетрационата с высокой репутацией, подходящий для инкубации при температуре 37°C).
- vi) После 24 и 48 часов селективного обогащения, делают отбор культуры со среды MSR/V или DIASALM, взяв петлей 1 мкл материала с края мутной зоны роста и сделав посевную штриховку на чашке с хромогенным агаром (например, агаром Рамбах) или со средой BGA и новобиоцином и еще на одной чашке с агаром XLD.
- vii) Делают посев 10 мкл бульона с тетрационатом на одну чашку с хромогенным агаром (например, агаром Рамбах) или со средой BGA и новобиоцином и агаром XLD.
- viii) Чашки инкубируют при 37°C в течение 24 часов.
- ix) Биохимически проверяют до пяти подозрительных колоний (красных/розовых с покраснением среды на чашке с BGA, темно-красных с бледными границами или оранжевыми/бесцветными на агаре Рамбах, красных с черным центром (или иногда прозрачных красных для штаммов, негативных по H₂S) на агаре XLD), используя сложные составные среды, такие как TSI, LDC с мочевиной, или применяя коммерческие биохимические тесты. Уровень серогруппы подтверждают, применяя поли-О и поли-Н антисыворотку (фаза 1 и фаза 2) или составные биохимические среды. Одного

серогруппирования недостаточно из-за перекрестных реакций с поливалентными сыворотками, например, у подвидов *Citrobacter*. Подтверждение можно получить при помощи различных биохимических тестов.

х) Очень подозрительные колонии, не дающие агглютинации с поли-Н антисыворотками на неселективных средах, субкультивируют, после чего тестирование повторяют. Если удастся получить выраженную поли-О и поли-Н агглютинацию, то этого достаточно для предположительного подтверждения. Биохимически и серологически подтвержденные культуры можно направить в референтную лабораторию для серотипирования. Если результаты теста на агглютинацию неясны, то выполняют дальнейшее биохимическое тестирование, используя составные среды, например, такие как TSI, ONPG с мочевиной, или коммерческие наборы для биохимического тестирования.

Этот метод отличается от ISO 6579:2002 и метода, описанного в его приложении D, в том отношении, что он допускает засев среды DIASALM вместо MSRV для селективного обогащения и использует хромогенный агар Рамбах в качестве первого плоского агара. Однако он дает дополнительную возможность выявления, комбинируя элементы обогащения в бульоне и на полутвердом агаре (Carrique-Mas *et al.*, 2009).

1.2. Методы количественного анализа

Количественное содержание *Salmonella* в инфицированных тканях можно определить прямым посевом, но для анализа фекальных, пищевых/кормовых или внешнесредовых образцов необходимы методики наиболее вероятного количества (MPN). Был описан миниатюризированный метод MPN (ISO, 2012) (Fravalo *et al.*, 2003). Кроме того, были разработаны методы количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

1.3. Идентификация подозрительных колоний

Подозрительные колонии субкультивируют на селективных и неселективных агарах для того, чтобы убедиться в отсутствии возможных загрязнителей, например, подвидов *Proteus*. Если развивается обильный чистый рост, то подозрительные колонии можно проверить реакцией агглютинации на предметном стекле с поливалентными антисыворотками для типирования *Salmonella* (Ellis *et al.*, 1976). В некоторых случаях подозрительная колония может не давать агглютинации или давать аутоагглютинацию, что заставляет применять биохимические тесты для подтверждения идентичности. Эти тесты могут быть выполнены, используя сахара пептонной воды или коммерческие системы; кроме того, для скрининга микроорганизмов можно использовать составные среды (такие как трехсахарный железосодержащий агар [TSI]) (Ewing, 1986). Особенно важно убедиться в том, что культуры *Salmonella*, используемые для определения резистентности к противомикробным препаратам, не имеют примесей других микроорганизмов, таких как *Pseudomonas*, которые вполне могут быть мультирезистентными. Приемлемым методом для идентификации *Salmonella* также является MALDI-TOF (времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы).

Выявление фактора (факторов) O, антигена (антигенов) H, и в особых ситуациях антигена Vi, характерного для *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* и *S. Dublin*, проводят методом прямой агглютинации на предметном стекле или агглютинации в пробирке с применением определенных антисывороток. Применительно к двухфазным микроорганизмам необходимо определить обе фазы при помощи фазовой инверсии. Это подразумевает пересев через полутвердый агар, содержащий иммунную сыворотку для известной фазы. Скрининг облегчается за счет доступных антисывороток, направленных против нескольких факторов, которые можно исследовать далее при помощи

моновалентных типизирующих сывороток. Имеется подробное описание серотипирования *Salmonella* (ISO, 2014; Grimont & Weill, 2007). Хотя многие лаборатории могут идентифицировать более распространенные серовары, обычно приходится использовать возможности референтной лаборатории, чтобы подтвердить идентичность выделенной культуры, включая фаготипирование (при доступности фагов, специфичных в отношении различных сероваров), а также для получения генетических характеристик.

Для определения некоторых вариантов сероваров могут потребоваться дополнительные биохимические анализы, например, сбраживание d-тартрата, которое используют для дифференциации варианта Java *S. Paratyphi B* (d-тарtrat +) от *S. Paratyphi B*. Выделенные культуры также необходимо анализировать на чувствительность к ряду противомикробных средств, поскольку возрастает озабоченность по поводу появления новых мультирезистентных штаммов, содержащих в своем геноме передаваемые следующим поколениям гены резистентности к цефалоспорином и фторхинолонам (Figueiredo *et al.*, 2015; Greene *et al.*, 2008). Живые вакцинные штаммы также обычно идентифицируют по маркерам резистентности к противомикробным препаратам, биохимическим изменениям, таким как аутокотрофия или погрешность.

1.4. Иммунологические и основанные на нуклеиновых кислотах методы распознавания

В практике используются многочисленные альтернативные методы выявления *Salmonella*, причем некоторые из них имеются в продаже. Они включают иммуномагнитную сепарацию (IMS) (Park *et al.*, 2011), ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени (Park *et al.*, 2014), твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) (Barrow, 1992; Wang *et al.*, 2015), ПЦР в режиме реального времени (Malorny *et al.*, 2004), количественную ПЦР (Piknova *et al.*, 2005) и микроматричный анализ (Porwollik *et al.*, 2004; Rasooly & Herold, 2008). Эти методы можно использовать для идентификации специфических сероваров *Salmonella* (Maurischat *et al.*, 2015a) или для дифференциации между живыми вакцинными штаммами и сероварами *Salmonella*, инфицирующими животных и птиц (Maurischat *et al.*, 2015b). Некоторые методы являются комбинированными и состоят из таких элементов, как двухступенчатое обогащение и ПЦР в режиме реального времени (Krascseniscova *et al.*, 2008). Многие из этих методов не были полностью аттестованы для применения на фекальных и внешнесредовых образцах, хотя общий прогресс очевиден (Eriksson & Aspan, 2007; Malorny & Hoorfar, 2005). Эти методы в большей степени подходят для анализа продуктов питания человека, когда обеспечение ингибиторами ПЦР не так проблематично, как при анализе фекалий (Kanki *et al.*, 2009), хотя есть потенциал для применения в этом тесте быстрых методов, а также для выпуска партий животных кормов без *Salmonella*. Применение быстрых методов обычно обходится дороже, чем традиционное культивирование, но могут быть экономически доступными для начального анализа материалов скрининга, где ожидается низкий риск загрязнения или отрицательный результат анализа таких материалов, как корма для животных. Метод обогащения/IMS в сочетании с твердофазным ИФА или ПЦР позволяет идентифицировать большую часть загрязнений материала *Salmonella* в течение 24 часов. Поскольку в настоящее время ни один из быстрых методов не продемонстрировал способности к прямому выявлению *Salmonella*, требуются стадии неселективного или селективного обогащения (Oliveira *et al.*, 2003). Как правило, для этого требуется большее число этапов и большие затраты времени оператора в процедуре выявления. Для методов на основе анализа ДНК ингибирование ПЦР элементами матрицы испытуемого образца, особенно в случае фекалий, создает проблему, то есть, требуются надежные методики выделения ДНК и средства контроля, способные выявить ингибирование реакции, которое может в некоторых случаях уменьшить чувствительность анализа (Jensen *et al.*, 2013). Существует много вариантов и разработок

в области быстрых методов выявления *Salmonella*, но до сих пор ни один такой метод при всех обстоятельствах не был способен удовлетворительно заменить культивирование. В отличие от этого, молекулярные методы серотипирования или субтипирования культур *Salmonella*, используются все более и более широко (EFSA, 2013), и некоторые наборы, в которых используются эти методы, пригодны для применения в небольших лабораториях, не располагающих всеми возможностями референтной лаборатории. Важно, чтобы используемые наборы были полностью аттестованы в соответствии с главой 1.1.6. Предпочтительно выбирать наборы, перечисленные в регистре МЭБ (см. <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/certification-of-diagnostic-tests/the-register-of-diagnostic-tests/>).

2. Серологические реакции

2.1. Серологическая идентификация инфицированных животных, стад и стай

Было разработано множество серологических реакций для диагностики инфекций, вызванных бактериями *Salmonella* у животных. У домашней птицы полный анализ крови, в котором используются окрашивание антигена и реакция сывороточной агглютинации (РСА), успешно применяли более 50 лет для идентификации массового инфицирования *S. Pullorum/Gallinarum* (см. главу 2.3.11). Поскольку *S. Enteritidis* обладает тем же групповым соматическим антигеном D, что и *S. Pullorum/Gallinarum* и, по-видимому, имеет с ними общее происхождение (Thomson *et al.*, 2008), полный анализ крови и связанные с ним анализы можно использовать для диагностики инфекции, вызванной *S. Enteritidis*, но с низкой чувствительностью. В последние годы для диагностики инфекций домашней птицы, вызванных *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*, а также инфекций, вызванных другими сероварами у сельскохозяйственных животных, были разработаны другие аналитические тесты, такие как твердофазный ИФА (Barrow, 1994). ИФА эффективно использовали для серологического выявления носительства *S. Dublin* у крупного рогатого скота, и его можно применять для проверки сборного молока при скрининге молочных стад. Твердофазный ИФА, включающий соматические антигены из смеси сероваров («микс-твердофазный ИФА»), применяют для диагностики инфекции *Salmonella* у свиней в Дании, Германии, Нидерландах, Великобритании и некоторых других странах. В качестве материала для этого анализа используется сыворотка или тканевая жидкость, полученная при замораживании и последующем оттаивании образцов мышц (Nielsen *et al.*, 1998). Сходный тест можно использовать для обнаружения антител к *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* в яичном желтке от непривитого сельскохозяйственного поголовья кур несушек.

Многие варианты твердофазного ИФА в настоящее время стали регулярно применимыми, а некоторые из них поступают в продажу. Имеется потребность в стандартизации их использования, и с этой целью в Дании³ и Нидерландах⁴ выпускают на коммерческой основе панели контрольных сывороток.

2.2. Факторы, влияющие на серологический диагноз

1. Серологические методы направлены скорее на идентификацию массовой инфекции в стадах/стаях, чем на индивидуальное выявление зараженных животных, хотя в стадах можно использовать повторные тесты как вспомогательное средство для выбраковки животных, хронических носителей сальмонелл. Серологические тесты обычно разрабатывают для выявления ограниченного диапазона сероваров или серогрупп *Salmonella*.

2. Хорошо известно, что некоторые животные с положительной серологической реакцией не могут приобрести инфицирование микроорганизмами *Salmonella*, и в

³ Институт сывороток Статенс, Копенгаген, Дания (www.ssi.dk)

⁴ GD, Девентер, Нидерланды (www.gddeventer.com)

странах с низкой распространенностью сальмонеллеза результаты исследований по оценке специфичности означают, что большинство положительных результатов являются ложноположительными. Животные, активно выделяющие сальмонеллы, могут быть серологически отрицательными на ранних стадиях болезни, а некоторые инфицированные особи животных никогда не дают сероконверсии. Животные с положительной серологической реакцией, возможно, перестали выделять сальмонеллы, хотя концентрации циркулирующего иммуноглобулина могут оставаться высокими. Другие животные на этой ферме также могут быть инфицированными. Животные с отрицательной серологической реакцией могут отражать недавнюю инфекцию с выделением сальмонелл еще до выработки иммуноглобулина на максимальном уровне или инфицирование менее инвазивными сероварами. Недавно инфицированные животные, по всей вероятности, в конечном итоге будут выявлены серологически в соответствующей программе мониторинга в период существования стада/стаи, но применение эффективных программ мониторинга часто ограничено по финансовым соображениям.

3. Новорожденные животные с незрелой иммунной системой не дают серологической реакции на соматический липосахаридный антиген до двух-трехнедельного возраста. Однако они способны серологически реагировать на жгутиковые белковые антигены. Особи крупного рогатого скота могут быть неактивными приблизительно до возраста 10–12 недель, а молочные поросята вообще не развивают иммунной реакции или дают ответ антителами, который отражает материнский иммунитет. У свиней для проведения различий между недавней инфекцией и инфекцией, приобретенной некоторое время назад, можно использовать разные варианты реакции, включающие различные классы антител (иммуноглобулин М, иммуноглобулин А, иммуноглобулин G), но этот подход часто неприменим для анализа стад, где индивидуальные животные, как правило, находятся на разных стадиях инфекции. Большинство тестов основано на иммуноглобулине G, а повышенный уровень антител появляется, как правило, спустя 1–3 недели после начала инфекции и продолжается 2–3 месяца.

Цыплята также могут приобрести антитела против *Salmonella* пассивно от своих родителей через желточный мешок, свидетельствуя о том, что родительское поколение в стае заражено или вакцинировано. Млекопитающие могут получить материнские антитела через молоко.

4. Для того чтобы сдерживать некоторые инфекции *Salmonella* у сельскохозяйственных животных, много лет использовали иммунизацию, поэтому, если возникает необходимость в серологической диагностике, надо дифференцировать вакцинную реакцию от иммунной реакции, развивающейся при реальной инфекции. Многие живые вакцины, введенные перорально, не вызывают у большинства животных значительной реакции сывороточных антител, но бывают случайные исключения, которые трудно интерпретировать. Инъекционные убитые вакцины, используемые для сдерживания *S. Enteritidis* у кур, могут привести к очень длительной выработке антител. Были созданы живые маркерные вакцины, которые можно отличить от полевых штаммов для экспериментального заражения из-за их противомикробной резистентности к рифампицину, а также при помощи ПЦР в режиме реального времени (Maurischat *et al.*, 2015b).

5. Влияние антибиотикотерапии на серологическую реакцию остается непонятным. Одни исследователи обнаруживали снижение титров антител после терапии, а другие не нашли никакого эффекта. Однако если была использована антибактериальная терапия, то серологическая диагностика является более полезной методикой для сальмонеллеза, чем культивирование.

6. Существует более 2 600 различных сероваров *Salmonella*. В зависимости от антигена и используемой аналитической методики могут наблюдаться перекрестные серологические реакции между различными сероварами, например, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum* и *S. Enteritidis*. В некоторых случаях также могут возникнуть перекрестные реакции в результате воздействия других микроорганизмов кроме *Salmonella*.

7. У домашней птицы можно проверить на иммуноглобулины *Salmonella* яичный желток, и анализ яиц может составить основу для скрининга сельскохозяйственного поголовья. Этот подход используется для мониторинга коммерческого яйценосного поголовья в Дании. У крупного рогатого скота для скрининга молочных стад можно проверять молоко на антитела против *Salmonella*.

8. Использование дисков из фильтровальной бумаги для сбора сыворотки устраняет необходимость в сепарировании сыворотки. Диски также обеспечивают длительное хранение материала и уменьшают расходы, связанные с транспортировкой в лабораторию. Чувствительность такого анализа может быть несколько меньше по сравнению с анализом свежей сыворотки.

2.3. Полный анализ крови

Полный анализ крови дает быстрый результат в отношении птичьего тифа и пуллороза, что можно использовать на сельскохозяйственных предприятиях. Чувствительность полного анализа крови невелика, поэтому в неопытных руках могут быть зарегистрированы как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. Подробное описание полного анализа крови представлено в главе 2.3.11.

2.4. Быстрый тест агглютинации на предметном стекле

Сыворотку (0,02 мл) смешивают с поливалентным антигеном, окрашенным кристаллическим фиолетовым (0,02 мл). Планшет осторожно покачивают в течение 2 минут, а затем считывают результат теста. Компоненты анализа хранят при 4°C и перед использованием доводят до комнатной температуры.

Испытуемые сыворотки должны быть свободными от загрязнений и продуктов гемолиза. Образцы сыворотки, которые какое-то время хранились, полезно центрифугировать.

Если возникает подозрение на неспецифические ложноположительные реакции, то положительные/подозрительные сыворотки можно проверить повторно после термической инактивации при 56°C в течение 30 минут.

2.5. Реакция сывороточной агглютинации

Реакция сывороточной агглютинации (РСА) не очень чувствительна, и у многих животных старшего возраста могут наблюдаться низкие уровни сывороточных агглютининов за счет других энтеробактерий кроме *Salmonella*. Единичные образцы не имеют существенной диагностической ценности кроме случаев первичного скрининга на основе материала из стада. Минимальным требованием для подтверждения активной инфекции являются парные образцы. Этот анализ относительно недорог: антигены можно приготовить достаточно просто, а дорогостоящее оборудование не требуется. РСА можно адаптировать к формату микротитрования и достаточно просто использовать для определения соматических и жгутиковых титров. Целесообразно использовать стандартные сыворотки и другие подтверждающие методы для контроля качества в отношении чистоты и иммуногенности антигенного препарата (препаратов) для РСА, что не зависит от сывороток, полученных при помощи этих антигенов. Данный метод был использован для идентификации контакта с разными сероварами *Salmonella*, например, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, *S. diarizonae* у индюков и *S. Abortusequi*.

2.5.1. Приготовление соматического антигена

- i) Берут пробу из соответствующей исходной культуры *Salmonella* для пересева в чашку с основой кровяного агара (ОКА) или другой подходящей средой для роста единичных колоний. Материал инкубируют в течение ночи при 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).
- ii) Выбирают гладкую колонию S-типа и проводят анализ методом агглютинации на предметном стекле, чтобы подтвердить присутствие необходимого соматического антигена.
- iii) Используя стерильную петлю, засевают наклонный питательный агар в универсальном контейнере материалом из выбранной колонии.
- iv) Культуру инкубируют 8–12 часов при 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).
- v) При помощи пастеровской пипетки отмывают культуру, предпочтительно, в ламинарном шкафу, используя приблизительно 2 мл абсолютного спирта, и переносят материал в стерильный универсальный контейнер.
- vi) Антиген оставляют на 4–6 часов при комнатной температуре, чтобы спирт убил бактерии и отделил жгутики.
- vii) Универсальный контейнер раскручивают в настольной центрифуге в течение 5 минут с ускорением 1000 g. Жидкость отливают и добавляют достаточное количество солевого раствора фенола, чтобы довести антиген до эквивалента непрозрачности в пробирке Брауна № 2 (приблизительно 10 колониеобразующих единиц/мл), или используя другой подходящий стандарт.
- viii) Выполняют стандартное титрование с известной сывороткой, чтобы убедиться в наличии положительного антигена для необходимого фактора.
- ix) Материал хранят в холодильнике при температуре 4°C до момента его использования.

2.5.2. Приготовление жгутиковых антигенов

- i) Делают отбор пробы из соответствующей исходной культуры *Salmonella* для пересева в чашку с ОКА или другой подходящей питательной средой. Материал инкубируют в течение ночи при 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).
- ii) Делают посев на полутвердый агар (приблизительно 0,3%) в пробирке Крейги или в другом подходящем контейнере, чтобы индуцировать оптимальную экспрессию соответствующего жгутикового антигена. Если в материале представлен двухфазный серовар, то к агару добавляют H-антисыворотку, соответствующую той фазе, которую надо подавить.
- iii) Чтобы проверить и подтвердить нужную фазу жизненного цикла *Salmonella*, используют агглютинацию на предметном стекле. Если все правильно, то петлю с культурой погружают в 20 мл питательного бульона. Для оптимального роста бактерий материал инкубируют в течение 12–18 часов при 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Если бактерии находятся в неправильной фазе, то делают повторный пассаж через полутвердый агар.
- iv) 250 мкл 40% формальдегида пипетируют в суспензию антигена (надо использовать перчатки и предпочтительно работать в ламинарном шкафу), после чего оставляют материал на ночь.
- v) Антиген проверяют методом РСА, используя соответствующую типизирующую сыворотку.

2.5.3. Процедура тестирования

- i) Проще всего скринировать сыворотки в разведении 1/20; 0,25 мл антигена добавляют к 0,25 мл сыворотки, предварительно разведенной в соотношении 1/10 в физиологическом растворе.
- ii) Анализируемый материал инкубируют в водяной бане при 50°C 24 часа для соматических антигенов и 4 часа для жгутиковых антигенов. Разведение и время инкубации варьируются в зависимости от используемых антисывороток.
- iii) Затем сыворотки, которые дают положительную реакцию, разбавляют от 1/20 до 1/320 и повторно анализируют с соответствующим антигеном.

2.6. Твердофазные иммуоферментные анализы для *Salmonella Enteritidis*

Доступны две основных базовых системы для выявления иммуноглобулина G (иммуноглобулина Y), специфичного для *S. Enteritidis*: непрямой твердофазный ИФА и конкурентный твердофазный ИФА типа «сэндвич» (Barrow, 1994).

Непрямой твердофазный ИФА включает применение выявляющего антигена, покрывающего лунки микротитрационного планшета. После нанесения блокирующего реактива для уменьшения неспецифического связывания анализируемые образцы вносят в лунки. Специфически связанное антитело в образце выявляют через конъюгат антитело/фермент. Было использовано множество антигенов, включая ЛПС, жгутики, реснички SEF14, белки наружной мембраны и неочищенные препараты цельноклеточного антигена.

В конкурентном твердофазном ИФА типа «сэндвич» для антигенного покрытия лунок используют специфичный реактив – моноклональное антитело (MA b) или поликлональное антитело. Вслед за этим используется очищенный или неочищенный препарат антигена. Анализируемые образцы вносят в лунки в сопровождении конъюгированного антитела, которое не будет связываться с антигеном при наличии в образце специфичных антител. Время анализа можно сократить, одновременно добавляя как анализируемый образец, так и конъюгат. Моноклональные антитела были получены для ЛПС, жгутиков и ресничек SEF14 *S. Enteritidis*.

Обе системы имеют как преимущества, так и недостатки. Непрямой анализ проще, кроме того, имеются доступные реактивы для всех сероваров *Salmonella*, выявленных у кур, индюков, уток и млекопитающих. Конкурентный твердофазный ИФА, который, в целом, демонстрирует более высокую специфичность, можно применять ко всем видам животных. Однако не для всех сероваров имеются коммерчески доступные реактивы. Также имеются некоторые проблемы аффинности, и этот метод менее чувствителен, чем непрямой анализ. В полевых условиях обе системы давали ложноположительные реакции, а в некоторых случаях скрининг непрямым твердофазным ИФА и ЛПС сопровождается подтверждением по методу конкурентного твердофазного ИФА со жгутиковым антигеном. Эту комбинацию использовали для дифференциации полевой инфекции, вызванной *S. Enteritidis*, от иммунной реакции на вакцину *Gallinarum* 9R, которая характеризуется отсутствием жгутиковых антигенов.

Оба типа анализов используют на материале сыворотки, яичного желтка или восстановленной высушенной крови, элюированной с дисков фильтровальной бумаги. В Дании и других странах микс-твердофазный ИФА (или твердофазный ИФА с мясным соком) используют для выявления инфекции *Salmonella* у свиней (Nielsen *et al.*, 1998). Этот твердофазный ИФА содержит ЛПС антигены «O» 1, 4, 5, 6, 7 и 12 от *S. Typhimurium* и *S. Choleraesuis*, что позволяет ему серологически выявить до 95% серогрупп *Salmonella*, обнаруженных у свиней в большинстве европейских стран. К некоторым наборам для твердофазного ИФА также были добавлены антигены группы D. Для

скрининга воспроизводящегося и размножающегося поголовья используют сыворотку, а для свиней на скотобойне, анализ обычно проводят на тканевой жидкости или «мясном соке», который высвобождается при оттаивании замороженного 10-граммового образца мышц.

Некоторые варианты твердофазного ИФА позволяют провести дифференциацию между инфекциями, вызванными сероварами *Salmonella* из разных серогрупп. Наблюдается некоторая перекрестная реакция между группами В и D и другими инвазивными сероварами. Однако если в твердофазном ИФА используется ЛПС антиген от гомологичного серовара, то, как правило, наблюдается большой ответ антител. До сих пор не был разработан и согласован на международном уровне оптимальный метод выбора «отсечки» для величины поглощения, выше которой сыворотки можно определить как материал из стада, инфицированного *S. Enteritidis*, не порождая при этом недопустимого уровня ложноположительных результатов.

Твердофазный можно легко адаптировать к технологии автоматизации, то есть, использовать в крупномасштабных программах тестирования. Основная проблема заключается в том, что необходимы дорогое оборудование, и многие дорогие реактивы. Доступно несколько коммерческих наборов твердофазного ИФА для *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и микс-твердофазного ИФА группы В/С. В идеале они должны пройти аттестацию в международных круговых исследованиях перед практическим применением в целях наблюдения.

В качестве примера аттестованного твердофазного ИФА можно привести метод, разработанный в референтной лаборатории МЭБ, А РНА, Вейбридж (адрес см. в таблице, приведенной в 4 части данного Руководства МЭБ по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных). Требования приведены ниже.

2.6.1. Оборудование

Планшеты из ПВХ, подходящие пипетки и мерные цилиндры, ультра-моечная машина для микрокультуральных планшетов, считыватель планшетов для твердофазного ИФА, аналитический фильтр 405–410 нм и эталонный фильтр 630 нм.

2.6.2. Антиген

i) Экстрагированный фенолом ЛПС *S. Enteritidis* доступен на коммерческой основе. Его восстанавливают в 1 мл деионизированной воды и хранят при -20°C аликвотами по 100 мкл в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФФР), рН 7,2 в концентрации 2,5 мг/мл. Для использования антиген должен оттаять в посадочном буфере при сохранении нужной концентрации.

ii) Антиген ЛПС также можно приготовить по методике Westphal & Luderitz (1954), стандартизировать по углеводной концентрации методом Gerhardt (1981) и подогнать до 1000 мкг/мл.

2.6.3. Разбавитель сыворотки и конъюгата

К ЗФФР (100 мл) добавляют бычий сывороточный альбумин (БСА) (2 г) и Tween 20 (0,05 мл). (В альтернативном варианте вместо БСА можно использовать сухое молоко [1 г]). Материал хранят при температуре 4°C и каждую неделю готовят свежие растворы.

i) Посадочный буфер

К деионизированной воде (1 литр) добавляют карбонат натрия (1,59 г), бикарбонат натрия (2,93 г) и подгоняют до уровня рН 9,6. Материал хранят при 4°C и обновляют каждые 2 недели.

ii) Субстратный буфер

Готовят 10% раствор (объем/объем) диэтаноламина в деионизированной воде. Диэтаноламин надо предварительно подогреть до 37°C перед дозированием, подогнав pH раствора до 9,8 1 М соляной кислотой. Материал хранят при 4°C и обновляют каждые 2 недели.

iii) Конъюгат фермента

Козий противокуриный иммуноглобулин или противокуриный глобулин других видов конъюгируют со щелочной фосфатазой. Материал хранят при температуре 4°C в разбавителе при соответствующей концентрации и обновляют каждую неделю.

iv) Ферментный субстрат

Одну таблетку *p*-нитрофенилфосфата динатрия (5 мг) растворяют в субстратном буфере (5 мл) не ранее чем за 30 минут перед дозированием и хранят в темном месте.

2.7. Стандарты

i) Положительная контрольная антисыворотка, приготовленная посредством внутримышечной инъекции четырем 1-недельным цыплятам, свободным от специфического патогенного микроорганизма, инокулята, содержащего 10⁶ *S. Enteritidis*. Через 3–4 недели, когда титры антител достигли максимума, получают сыворотку.

ii) Отрицательная контрольная сыворотка А от четырех 1-недельных птиц, свободных от специфического патогенного микроорганизма.

iii) Отрицательная контрольная сыворотка В от 58 1-недельных племенных птиц, заведомо свободных от инфекций *Salmonella*. Сыворотки объединяют и хранят в объемах по 100 мкл при температуре –20°C.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Вводная информация

1.1. Обоснование и предполагаемое использование препарата

В практике используют многие инактивированные вакцины против сальмонеллеза, вызванного различными сероварами сальмонелл у разных видов животных и птиц, включая комбинированную вакцину *Enteritidis* и *S. Typhimurium* для домашней птицы. Инактивация обычно достигается или посредством нагревания, или за счет использования формалина и адьюванта, например, гидроокиси алюминия или минерального масла. Во многих странах также использовались живые вакцины, включая полусероховатые штаммы, такие как 9R для птичьего тифа и HWS51 для инфекций *S. Dublin* (Mastroeni *et al.*, 2001). Другие аттенуированные вакцины включают ауксотрофные мутанты и мутанты «метаболического дрейфа», которые используют для предотвращения инфекций *Salmonella* у сельскохозяйственных животных в Германии, а также для *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у домашней птицы в Великобритании и других странах. Для домашней птицы и других видов были разработаны мутантные вакцины, рационально аттенуированные при помощи молекулярно-биологических методик генной делеции. Они включают мутанты гена *aroA* и штаммы с мутациями в генах кодирующих аденилатциклазу (*сya*) и рецепторный белок циклического аденозинмонофосфата (*сгp*) (Desin *et al.*, 2013; Hassan & Curtiss III, 1997). Рекомендации по производству ветеринарных вакцин даны в главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарной вакцины*. Рекомендации, приведенные здесь и в главе 1.1.8, носят общий характер и могут быть дополнены с учетом национальных и региональных требований. Производство большинства вакцин организовано как высоко индустриальный коммерческий процесс, который находится под контролем национальных лицензирующих органов по ветеринарным лекарствам. Частные лаборатории производят экстренные стадные

вакцины или аутогенные вакцины в меньшем количестве, но каждое производство такого рода должно получить специальное лицензирование.

2. Краткое описание производства и минимальные требования к традиционным вакцинам

2.1. Характеристики посевного вируса

2.1.1. Биологические характеристики

Бактериальный штамм для убитых или живых вакцин должен представлять собой микроорганизм, по возможности, максимально близкий к циркулирующим в настоящее время полевым штаммам. Его надо тщательно выбирать из материала, связанного со случаями тяжелой клинической болезни, а также обязательно оценивать вирулентность и выработку антигенов. Лучше всего провести подробную оценку группы потенциальных штаммов прежде, чем анализировать конечный выбор одного штамма. Конечный вакцинный штамм должен быть идентифицирован по хронологическим записям и охарактеризован стабильными фенотипическими или генетическими маркерами. Живые вакцинные штаммы должны быть маркированы стабильными признаками, позволяющими отличить их от штаммов дикого типа. Можно использовать такие маркеры как резистентность к противомикробным препаратам, например, рифампицину, или ауксотрофные мутации. Ослабление вирулентности должно быть стабильным и, предпочтительно, полученным за счет двух определенных независимых мутаций. Стабильность живых вакцинных штаммов можно верифицировать регулярными проверками, используя чувствительный молекулярный метод идентификационных отпечатков и микроматричные методики.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от посторонних примесей)

i) Стерильность и чистота

Вакцинный штамм должен быть проверен следующим образом:

- a) Окрашивание пятна бактериальной суспензии на предметном стекле по Граму.
- b) Гомогенизация культуры на неселективных питательных средах.
- c) Метаболические потребности по результатам биохимических анализов.
- d) Выявление маркеров и фаготипа.
- e) Агглютинация со специфической антисывороткой.
- f) Вакцинная культура и любые адъюванты, консерванты или другие материалы должны быть микробиологически стерильными и нетоксичными в рабочих концентрациях.

ii) Безопасность

Можно определить показатели LD₅₀ (50% смертельная доза) или ID₅₀ (50% инфекционная доза) на мышах либо (предпочтительно) проверить на целевых видах признаки относительно умеренных неблагоприятных реакций. Целевым видам животных надо ввести в рекомендуемом возрасте и рекомендуемым способом десятикратную полевую дозу живой вакцины или двойную дозу убитой вакцины. За животными ведут наблюдение, чтобы убедиться в отсутствии неблагоприятных реакций. Для живых вакцин надо продемонстрировать стабильность и невозвращение к вирулентности после серии пассажей на чувствительных видах. Также необходимо иметь в виду повторную вакцинацию. Надо продемонстрировать, что живая вакцина ненадолго сохраняется у привитых животных, не передается в молоко или яйца, употребляемые в пищу, а метод введения вакцины не представляет опасности для операторов.

iii) Эффективность

Эффективность вакцины надо продемонстрировать в лабораторных экспериментах и полевых испытаниях. Лабораторные эксперименты включают тесты с вакцинной провокацией на целевых видах с соблюдением рекомендаций по дозе и возрасту животных. Данные по эффективности также можно использовать как основу для проверки мощности партий вакцины. Полевые испытания по проверке эффективности вакцины труднее проводить из-за сложностей со стандартизацией, провокацией и обеспечением надежного контроля.

iv) Внешнесредовые аспекты

Живые вакцинные штаммы необходимо проверять на их способность сохраняться в окружающей среде и инфицировать нецелевые виды, например, грызунов и диких птиц, которые, вероятно, будут вступать в контакт с вакцинными бактериями. Недопустимую экологическую опасность представляет длительное выживание некоторых живых вакцин в фекалиях и мусоре при удалении такого материала со скотных дворов. Живые вакцины нельзя использовать в коммерческом поголовье яйценосных птиц во время кладки яиц.

2.2. Способ изготовления

2.2.1. Описание процедуры производства

Посевную культуру размножают и поддерживают, используя подходящие питательные среды для роста *Salmonella*. Используемые среды не должны содержать сыворотку или животные ткани (если это специально не разрешено национальными правилами). Культуру можно поддерживать на твердой среде, в колбах Ру или в жидкой среде, причем в этом случае может использоваться крупномасштабное оборудование для ферментативных процессов. Ограниченное содержание железа и инкубация при низкой температуре на минимальной среде могут увеличить выработку антигена ЛПС вакцинным штаммом.

Производство вакцины должно находиться в подходящих чистых помещениях с доступом только для рабочего персонала. Необходимо соблюдать осторожность во избежание перекрестной контаминации между зонами обработки живых микроорганизмов и другими рабочими областями. Надо избегать контаминации от операторов или из окружающей среды, а приготовление вакцин должно происходить в зоне, отделенной от работы с диагностическими культурами. Недопустима работа с вакциной нездоровых операторов, а также лиц с ослабленным иммунитетом или принимающих иммуномодулирующие препараты. Персонал должен быть обеспечен защитной одеждой в зонах производства и в помещениях для животных.

Культуры посевной серии получают из первичной маточной культуры, а число пассажей зависит от аттестации процесса. Вакцину можно приготовить посредством посева на подходящую среду, например, питательный бульон со свежей культурой, а также с последующей инкубацией на вибраторе при 37°C в течение 24 часов, с аэрацией или без аэрации. Микроорганизмы собирают посредством осаждения или центрифугирования. В альтернативном варианте микроорганизмы можно выращивать и собирать на твердой среде, такой как питательный агар. Для получения живых вакцин суспензию разводят в ЗФФР при рН 7,0 и лиофилизируют (по выбору).

Время инактивации убитых вакцин должно составлять, по меньшей мере, на 33% больше по сравнению с сокращением количества жизнеспособных бактерий до уровня, находящегося ниже порога обнаружения. Процесс инактивации обязательно применяют ко всему объему собранных вакцинных клеток.

Консерванты, наполнитель для лиофилизации, стабилизатор для мультидозовых контейнеров или другие вещества, добавляемые к заготовке вакцины, не должны

оказывать какого-либо вредного влияния на иммунизирующую активность конечного продукта.

2.2.2. Требования к субстратам и средам

Все используемые химические реактивы и питательные среды заведомо должны соответствовать целевому назначению и проходить проверку при помощи адекватных средств контроля.

2.2.3. Активный контроль в процессе обработки

Особого внимания требуют следующие моменты:

- i) Визуальный контроль суспензии, однородное окрашивание по Граму, рост культуры на неселективной среде.
- ii) Агглютинация на предметном стекле со специфическими антисыворотками.
- iii) Титрование бактерий методом нефелометрии или чашечного подсчета колоний.
- iv) Проверка на эффективную инактивацию (убитая вакцина) посредством посева на неселективную среду либо использование среды, которая дает оптимальный шанс для восстановления, например, производственная среда с нейтрализацией инактивирующего соединения.
- v) Титрование жизнеспособных бактерий (живая вакцина) до и после лиофилизации.

2.2.4. Испытания партии готового препарата

i) Стерильность/чистота

Тестирование биологических материалов на стерильность и отсутствие загрязнений подробно описано в главе 1.1.9 данного Руководства МЭБ по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных.

ii) Безопасность

Для того чтобы определить отсутствие вредных воздействий вакцины на привитых животных, можно использовать лабораторный тест, который ранее показал корреляцию с безопасностью для целевых видов. Каждая партия должна быть проверена на целевых видах с учетом рекомендаций по возрасту животных и способу введения вакцины. При этом используют, по меньшей мере, двойную полевую дозу для убитых вакцин и десятикратную дозу для живых вакцин. Ведут наблюдения за любыми неблагоприятными эффектами в отношении поведения и здоровья вакцинированных животных, а также получают оценку тканевой реакции в месте инъекции.

iii) Активность партии

Мощность оценивают, применяя анализ с вакцинной провокацией у мышей или других видов, включая (если это практично) целевые виды с учетом их иммунологической реакции. Многие вакцины *Salmonella* предназначены для использования у домашней птицы, таким образом, они обязательно должны проходить тестирование на мощность и безопасность.

2.3. Требования к регистрации

2.3.1. Требования к безопасности

Некоторые убитые вакцины иногда способны вызывать аборт у беременных животных из-за содержания ЛПС, и, аналогичным образом, живые вакцины также необходимо использовать для беременных животных с осторожностью. Однако нередко возникает необходимость в вакцинации беременных самок, чтобы обеспечить материнский иммунитет для их потомства. Полезно включать в программу контроля безопасности

анализ на эндотоксины, чтобы выявить такой уровень, который сравним по безопасности с результатами анализов с двойной дозой вакцины. Вакцины также могут вызвать появление припухлости в месте инъекции, особенно при использовании адъюванта типа масляной эмульсии.

i) Безопасность целевых и нецелевых животных

Убитые вакцины оценивают в тесте с двойной дозой, а живые вакцины в тесте с десятикратной дозой, что лучше всего анализировать на целевых видах. Для живых вакцин необходимо доказывать безопасность в отношении важных нецелевых видов, которые могут подвергаться воздействию вакцин, экскретированных привитыми животными.

ii) Возврат к вирулентности для аттенуированных/живых вакцин

В тестах на репликацию у целевых видов надо продемонстрировать, что живые вакцины не возвращаются к вирулентным штаммам при достаточно большом числе повторных репликаций. Для мутаций, особенно, неопределенных, надо продемонстрировать стабильность, причем проверку стабильности можно проводить при помощи молекулярных методов идентификационных отпечатков или секвенирования. Хотя риск невелик, разумно не использовать живые вакцины в той стране, где исходный штамм для вакцины был элиминирован.

iii) Внешнесредовые соображения

Живые вакцинные штаммы не должны реплицироваться или длительно выживать в окружающей среде.

2.3.2. Требования к эффективности

i) Для животноводства

Длительность иммунитета, вероятно, может значительно изменяться в зависимости от вакцинных продуктов, режимов вакцинации и привитых особей животных. Иммунитет в отношении *Salmonella* обычно специфичен для серовара или серогруппы. Консультации между коллегами позволяют предположить, что большинство убитых вакцин обеспечивают некоторую иммунную защиту в течение 6 месяцев, а некоторые живые вакцины, введенные посредством инъекций, способны вызвать более сильный иммунитет, который сохраняется в течение 1 года или более. Однако следует помнить, что сильная провокация, например, связанная с постоянно занятой территорией фермы или с зараженными грызунами, может преодолеть вакцинный иммунитет, а коммерческие живые вакцины могут быть ослаблены для меньшего выживания в окружающей среде, но это ослабление также уменьшает иммунную реакцию. Также не следует забывать о проблемах, связанных с возможной неэффективностью перорального введения живых вакцин или возможной неточностью инъекций при введении убитых и живых инъекционных вакцин. Вакцины *Salmonella* предназначены для ограничения тяжести клинического заболевания у жвачных животных, свиней и инфекции *S. Gallinarum* у домашней птицы. По возможности, проверка мощности должна включать оценку эффективности вакцины для целевых видов, а для анализа производственных партий должны быть применены адекватные критерии. По возможности, надо оценивать убитые вакцины по вызываемой реакции антител О-Н, хотя следует помнить, что сывороточные антитела представляют только часть защитного механизма хозяина против *Salmonella*. В альтернативном варианте мощность вакцины можно оценить по ее эффекту, производимому у привитых животных, при количественном и статистическом сравнении с непривитым контролем.

ii) Для сдерживания и искоренения инфекции

Вакцины *Salmonella* неспособны искоренить инфекцию в стадах или стаях животных, но могут увеличить порог восприимчивости для инфекции, снизить уровень выделения микроорганизма и уменьшить вертикальную передачу у домашней птицы, которая приводит к загрязнению инкубационных или употребляемых в пищу яиц. Следовательно, вакцинацию надо рассматривать как вспомогательное средство в комплексе мероприятий по сдерживанию и искоренению сальмонеллезной инфекции, включающем выбраковку животных, производство продукции по принципу all in – all out (использование птичника с однократным заполнением и последующей однократной реализации птицы), биологическую безопасность и гигиену ферм.

iii) Стабильность

Следует отметить недостаточность информации о стабильности убитых вакцин. На стабильность влияют условия хранения и присутствие загрязняющих микроорганизмов, дающих рост в вакцинном продукте. В убитые бактериальные вакцины часто включают в качестве консервантов химические вещества с противомикробной активностью, такие как тиомерсал, фенол или кристаллический фиолетовый. Для оценки стабильности используют анализы на мощность, повторяемые с определенной периодичностью. Стабильность живых вакцин можно оценить, выполнив подсчет количества жизнеспособных микроорганизмов, повторяемый с определенной периодичностью, а также при помощи тестов на генотипирование, позволяющих выявить генетические изменения в процессе ферментации. Не рекомендуется использовать живые вакцины, содержащие серовары *Salmonella*, которые неэндемичны в конкретном регионе, для контроля других сероваров (van Immerseel *et al.*, 2013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- BARROW P.A. (1992). ELISAs and the serological analysis of salmonella infections in poultry: a review. *Epidemiol. Infect.*, 109, 361-369.
- BARROW P.A. (1994). Serological diagnosis of *Salmonella* serotype Enteritidis infections in poultry by ELISA and other tests. *Int. J. Food Microbiol.*, 21, 55-68.
- BARROW P.A. & NETO O.F. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid - new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol.*, 40 (1), 1-13.
- BARROW P.A. & METHNER U., EDS (2013). *Salmonella in domestic animals*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- CANNON R.M. & NICHOLLS T.J. (2002). Relationship between sample weight, homogeneity, and sensitivity of fecal culture for *Salmonella enterica*. *Vet. Diagn. Invest.*, 14, 60-62.
- CARRIQUE-MAS J.J., BARNES S., MCLAREN I. & DAVIES R. (2009). Comparison of three plating media for the isolation of *Salmonella* from poultry environmental samples in Great Britain using ISO 6579:2002 (Annex D). *J. Appl. Microbiol.*, 107, 1976-1983.
- CARRIQUE-MAS J.J. & DAVIES R.H. (2008). Sampling and bacteriological detection of *Salmonella* in poultry and poultry premises: A review. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 27 (3), 665-677.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2013). An Atlas of Salmonella in the United States, 1968-2011: Laboratory-based Enteric Disease Surveillance. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, Georgia, USA.
- DESIN T.S., KOSTER W. & POTTER A.A. (2013). Salmonella vaccines in poultry: past, present and future. *Exp. Rev. Vaccines*, 12, 87-96.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2013). EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling,

outbreak investigation and scanning surveillance: Part 1 (evaluation of methods and applications). *EFSA Journal*, 11 (12), 3502 [84 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2013.350.

ELLIS E.M., WILLIAMS J.E., MALLINSON E.T., SNOEYENBOS G.H. & MARTIN W.J. (1976). *Culture Methods for the Detection of Animal Salmonellosis and Arizonosis*. Iowa State University Press, Ames, USA.

ERIKSSON E. & ASPAN A. (2007). Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Vet. Res.*, 3, 21-40.

EWING W.H. (1986). *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*, Fourth Edition. Elsevier, New York, USA, London, UK, and Amsterdam, The Netherlands.

FIGUEIREDO R., HENRIQUES A., SERENO R., MENDOQA N. & DA SILVA G.J. (2015). Antimicrobial resistance and extended-spectrum p-lactamases of *Salmonella enterica* serotypes isolated from livestock and processed food in Portugal: an update. *Foodborne Pathog. Dis.*, 12 (2), 110-117.

FRAVALO P., HASCOET Y., LEFELLIC M., QUEGUINER S., PETTON J. & SALVAT G. (2003). Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella enterica* contamination: The mini-MSRV MPN technique. *J. Rapid Method Automat. Microbiol.*, 11 (2), 81-88.

FRICKER C.R. (1987). The isolation of salmonellas and campylobacters. *J. Appl. Bacteriol.*, 63, 99-116.

GERHARDT P. (1981). *Manual of Methods for General Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 332-334.

GREENE S.K., STUART A.M., MEDALLA F.M., WHICHARD J.M., HOEKSTRA R.M. & CHILLER T.M. (2008). Distribution of multidrug-resistant human isolates of MDR-ACSSuT *Salmonella* Typhimurium and MDR-AmpC *Salmonella* Newport in the United States, 2003-2005. *Foodborne Pathog. Dis.*, 5 (5), 669-680.

GRIMONT P.A.D. & WEILL F.-X. (2007). *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*, Ninth Edition, World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.

HARVEY R.W.S. & PRICE T.H. (1974). *Isolation of Salmonellas*. Public Health Laboratory Service. Monograph Series 8. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.

HASSAN J.O. & CURTISS R. III (1997). Efficacy of a live avirulent *Salmonella typhimurium* vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. *Avian Dis.*, 41, 783-791.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2002). ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2007). ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (Annex D). Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in samples of the primary production stage - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2012). ISO/TS 6579-2:2012. Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2014). ISO/TR 6579-3:2014. Microbiology of the food chain -Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 3: Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

- ISSENHUTH-JEANJEAN S., ROGGENTIN P., MIKOLEIT M., GUIBOURDENCHE M., DE PINNA E., NAIR S., FIELDS P.L. & WEILL, F. X. (2014). Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.*, 165 (7), 526-530.
- JENSEN A.N., NIELSEN L.R. & BAGGESEN D.L. (2013). Use of real-time PCR on fecal samples for detection of sub-clinical *Salmonella* infection in cattle did not improve the detection sensitivity compared to conventional bacteriology. *Vet. Microbiol.*, 163, (3-4), 373-377
- KANKI M., SAKATA J., TAGUCHI M., KUMEDA Y., ISHIBASHI M., KAWAI T., KAWATSU K., YAMASAKI W., INOUE K. & MIYAHARA M. (2009). Effect of sample preparation and bacterial concentration on *Salmonella enterica* detection in poultry meat using culture methods and PCR assaying of preenrichment broths. *Food Microbiol.*, 26 (1), 1-3.
- KRASCSENICSOVA K., PIKNOVA L., KACLIKOVA E. & KUCHTA T. (2008). Detection of *Salmonella enterica* in food using two-step enrichment and real-time polymerase chain reaction. *Lett. Microbiol.*, 46, 483-487.
- LEE K.M., RUNYON M., HERRMAN T.J., PHILLIPS R. & HSIEH J. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264-276.
- MALORNY B. & HOORFAR J. (2005). Toward standardization of diagnostic per testing of fecal samples: lessons from the detection of salmonellae in pigs. *J. Clin. Microbiol.*, 43 (7), 3033-3037.
- MALORNY B., PACCASSONI E., FACH P., BUNGE C., MARTIN A. & HELMUTH R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 7046-7052.
- MASTROENI P., CHABALGOITY J.A., DUNSTAN S.J., MASKELL D.J. & DOUGAN G. (2001). *Salmonella*: Immune responses and vaccines. *Vet. J.*, 161, 132-164.
- MAURISCHAT S., BAUMANN B., MARTIN A. & MALORNY B. (2015a). Rapid detection and specific differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis, Typhimurium and its monophasic variant 4,[5],12:i:- by real-time multiplex PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, 193, 8-14.
- MAURISCHAT S., SZABO L., BAUMANN B. & MALORNY B. (2015b). Rapid real-time PCR methods to distinguish *Salmonella* Enteritidis wildtype field isolates from vaccine strains Salmovac SE/Gallivac SE and AviPro *Salmonella* Vac E. *J. Microbiol. Methods*, 112, 92-98.
- NIELSEN B., EKEROTH L., BAGER F. & LIND P. (1998). Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. *J. Vet. Diagn Invest.*, 10, 158-163.
- OLIVEIRA S.D., RODENBUSCH M.C. CE, ROCHA S.L.S. & CANAL C.W. (2003). Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36, 217-221.
- PARK S.H., AYDIN M., KHATIWARA A., DOLAN M.C., GILMORE D.F., BOULDIN J.L., AHN S. & RICKE S.C. (2014). Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiol.*, 38, 250-262.
- PARK S.H., JARQUIN R., HANNING L., ALMEIDA G. & RICKE S.C. (2011). Detection of *Salmonella* spp. survival and virulence in poultry feed by targeting the *hila* gene. *J. Appl. Microbiol.*, 111, 426-432.
- PIKNOVA L., KACLIKOVA E., PANGALLO D., POLEK B. & KUCHTA T. (2005). Quantification of *Salmonella* by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction targeted to *fimC* gene. *Curr. Microbiol.*, 50, 38-42.
- PORWOLLIK S., BOYD E.F., CHOY C., CHENG P., FLOREA L., PROCTOR E. & MCCLELLAND M. (2004). Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by

use of microarrays. *J. Bacteriol.*, 186, 5883-5898.

RASOOLY A. & HEROLD K.E. (2008). Food microbial pathogen detection and analysis using DNA microarray technologies. *Foodborne Pathog. Dis.*, 5 (4), 531-550.

REISSBRODT R. (1995). Conventional and alternative methods for isolation and identification of *Salmonella* - an overview. *Biotest Bull.*, 5, 143-156.

THOMSON N.R., CLAYTON D.J., WINDHORST D., VERNIKOS G., DAVIDSON S., CHURCHER C., QUAIL M.A., STEVENS M., JONES M.A., WATSON M., BARRON A., LAYTON A., PICKARD D., KINGSLEY R.A., BIGNELL A., CLARK L., HARRIS B., ORMOND D., ABDELLAH Z., BROOKS K., CHEREVACH I., CHILLINGWORTH T., WOODWARD J., NORBERCZAK H., LORD A., ARROWSMITH C., JAGELS K., MOULE S., MUNGALL K., SANDERS M., WHITEHEAD S., CHABALGOITY J.A., MASKELL D., HUMPHREY T., ROBERTS M., BARROW P.A., DOUGAN G. & PARKHILL J. (2008). Comparative genome analysis of *Salmonella enteritidis* Pt4 and *Salmonella Gallinarum* 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.*, 18 (10), 1624-1637.

VAN IMMERSEEL F., STUDHOLME D.J., EECKHAUT V., HEYNDRICKX M., DEWULF J., DEWAELE I., VAN HOOREBEKE S., VAN MEIRHAEGHE H., DUCATELLE R., PASZKEIWICZ K. & TITBALL R.W. (2013). *Salmonella Gallinarum* field isolates from laying hens are related to the vaccine strain SG9R. *Vaccine*, 31 (43), 4940-4945.

VOOGT N., RAES M., WANNET W.J.B., HENKEN N.M. & VAN DE GIESSEN A.W. (2001). Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. *Lett. Appl. Microbiol.*, 32, 89-92.

WANG W., LIU L., SONG S., TANG L., KUANG H. & XU C. (2015). A highly sensitive ELISA and immune- chromatographic strip for the detection of *Salmonella typhimurium* in milk samples. *Sensors*, 15, 5281-5292.

WESTPHAL O. & LUDERITZ O. (1954). Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. *Angew. Chem.*, 66, 407-417.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1994). Guidelines on Detection and Monitoring of *Salmonella* Infected Poultry Flocks with Particular Reference to *Salmonella enteritidis*. Wray C. & Davies R.H., eds. WHO, Geneva, Switzerland, ZOON/94.173.

NB: Имеются справочные референтные лаборатории МЭБ по сальмонеллезу

(См. Таблицу в части 4 данного *Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных* или посетите веб-сайт МЭБ для получения новейшей справочной информации по адресу: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Обращайтесь в референтные лаборатории МЭБ за любой дополнительной информацией по диагностическим тестам, реактивам и вакцинам для сальмонеллеза.