

УДК 579.842.14:579.62

**ОЦЕНКА УРОВНЯ ПАТОГЕННОСТИ  
ГЕНОМОДИФИЦИРОВАННОГО ШТАММА SALMONELLA  
TYPHIMURIUM В ОТНОШЕНИИ ОРГАНИЗМА  
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

**Кабанова Л.Р.**

*ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет»,  
Оренбург, e-mail: hafizova.15@mail.ru*

В статье представлены данные анализа уровня патогенности дикого штамма *S. typhimurium* 14028S WT и генномодифицированного штамма *S. typhimurium* 14028S ΔluxS на организм лабораторных животных по средству определения количества колониеобразующих единиц (КОЕ) исследуемых микроорганизмов в фекалиях и крови лабораторных животных. В ходе проведенных исследований было установлено, что оба исследуемых штамма приводят к развитию генерализованной инфекции с максимальным поражающим эффектом на 6 день исследования, о чем свидетельствует выделение вышеперечисленных микроорганизмов из крови, печени, селезенки и фекалий. В качестве модели *in vivo* в эксперименте были использованы лабораторные крысы линии Wistar в количестве 27 штук. Эксперимент включал в себя 4 убоя с интервалом в 3 дня.

**Ключевые слова:** *Salmonella typhimurium*, колониеобразующие единицы, кровь, фекалии.

**ESTIMATION OF THE LEVEL OF PATHOGENICITY  
OF THE GENEMODIFICATED STAMP OF SALMONELLA TYPHIMURIUM  
IN CONNECTION WITH THE ORGANISM OF LABORATORY ANIMALS**

**Kabanova L.R.**

*FGBOU V Orenburg State University, Orenburg, e-mail: hafizova.15@mail.ru*

The article presents the analysis of the level of pathogenicity of the wild strain of *S. typhimurium* 14028S WT and the genetically modified strain of *S. typhimurium* 14028S ΔluxS on the organism of laboratory animals using the means for determining the number of colony forming units (CFU) of the microorganisms in the feces and blood of laboratory animals. In the course of the studies, it was found that both strains investigated lead to the development of a generalized infection with the maximum striking effect on day 6 of the study, as evidenced by the isolation of the above microorganisms from blood, liver, spleen and faeces. As a model for *in vivo* experiment, we used laboratory rats of Wistar line in the amount of 27 pieces. The experiment included 4 slaughter interval of 3 days.

**Keywords:** *Salmonella typhimurium*, colony forming units, blood, feces.

Основной причиной распространения микроорганизмов в различных экологических условиях является их способность к адаптации, которая усиливает резистентность к неблагоприятным условиям среды. Данная устойчивость характеризуется: клеточной дифференциацией в специализированных структурах [1] и специфической индукцией генов стресс-ответа, усиливающих метаболическую устойчивость вегетативных клеток [2].

К инфекционным болезням относится большая группа заболеваний, которые вызывают патогенные возбудители. Главное отличие инфекционных заболеваний – контактируемость, т.е. данные болезни передаются от больных людей или животных к здоровым. Для данных болезней характерны специфичность возбудителя, цикличность течения и формирование в процессе болезни иммунитета. Инфекционные заболевания способны к массовому (эпидемическому) распространению [3].

Особое значение уделяется инфекционным поражениям желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Возбудителями данных поражений являются патогенные и условно-патогенные микроорганизмы [4]. Помимо этого, заболевания ЖКТ могут вызываться вирусами и некоторыми простейшими. Общим для этой группы инфекций является орально-фекальный путь заражения (через пищу, воду). В зависимости от особенностей возбудителя инфекции, патогенеза, характера течения и тяжести процесса, определяющих тактику терапии, каждое заболевание в зависимости от этиологии рассматривается отдельно [5, 6].

В настоящее время глобальное распространение сальмонеллеза, рост заболеваемости, развитие вспышек внутри больниц, антибиотикорезистентность возбудителя, тяжесть течения локализованных форм и высокая летальность при генерализованных формах служат причиной многочисленных исследований.

Целью исследования является изучение влияния дикого *Salmonella typhimurium* 14028S WT и генномодифицированного штаммов *Salmonella typhimurium* 14028S ΔluxS на организм лабораторных животных. В данной работе представлены данные по определению количества колониеобразующих единиц (КОЕ) *S. typhimurium* 14028S ΔluxS, *S. typhimurium* 14028S WT в фекалиях и крови лабораторных животных

В качестве объектов исследования нами использовались: *S. typhimurium* 14028S WT – дикий штамм, *S. typhimurium* 14028S ΔluxS – в данном штамме вырезан ген luxS, который отвечает за кодирование белка LuxS (синтаза аутоиндукторов II типа) и белка S-рибозилгомоцистеинлиазы (семейство углерод-сералиаз, катализирует реакцию расщепления S-(5-дезоксид-рибозил-5)-L-гомоцистеина).

В качестве модели *in vivo* в эксперименте были использованы лабораторные крысы линии Wistar в количестве 27 штук. Животные отбирались в соответствии общепринятых принципов подбора аналогов сходных по возрасту (четырёхмесячные крысы), физиологическому состоянию, питанию и поведению, находившиеся в пределах физиологической нормы животных, живой массе (от 200 до 250 грамм), пол лабораторного животного – самцы.

Крысы являются одними из основных экспериментальных систем в биологических и медицинских исследованиях. За долгие годы были выведены специальные лабораторные крысы. Благодаря быстрому метаболизму, неагрессивности и неприхотливости они до сих пор остаются одним из основных объектов во многих отраслях биологии.

Область использования: токсикологические исследования, изучение вопросов питания, стандартизация гормональных препаратов, различные исследования, а также изучение опухолей и инфекционных заболеваний.

Так как механизм передачи сальмонеллеза является фекально-оральным, а основной путь передачи – пищевым, то очагами воспаления этого заболевания являются селезенка, печень.

Для решения поставленной задачи использовали метод определения КОЕ исследуемых микроорганизмов в фекалиях на протяжении всего эксперимента (с 1 по 12 сутки исследования).

Перед проведением количественных высевов определяли массу образца(ов) из каж-

дой группы и помещали их в пробирки Эппендорф, содержащие изотонический раствор хлорида натрия в объеме, соответствующем весу образца. Далее производилась гомогенизация на приборе TissueLyser LT (QIAGEN – фирма производитель) с использованием металлических шариков при 20 оборотах/мин в течение 30 секунд. Затем мы проводили осаждение непереваренных остатков пищи на приборе Вортекс. После осаждения отбирали надосадочную жидкость, которую высевали на среду Плоскирева в чашках Петри, в разведениях с  $10^{-1}$  по  $10^{-4}$ .

После инкубации чашек Петри с посевом суспензий фекальных масс в течение суток при температуре 37 °С определяли число выросших колоний и подсчитывали количество КОЕ.

Определение КОЕ патогенных бактерий в крови и органах-мишенях (печень и селезенка) лабораторных животных определяли следующим образом. Клетки бактерий выращивали на среде LB (Luria-Bertani), содержащей на один литр: 10 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl, pH 7,5, в термостатируемом шейкере-инкубаторе IS-971R «JEIO TECH», Корея при 160 оборотах/мин и 28 °С. При необходимости в среде добавляли канамицин в концентрации 34 мкг/мл. В качестве инокулята использовали культуры стационарной фазы роста с оптической плотностью клеточной суспензии – 0,3 оптических единиц и длиной волны 600 нм.

Штаммы бактерий *Salmonella typhimurium* вводили перорально в дозе  $5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Убой животных производили на 3, 6, 9 и 12 сутки после заражения путем декапитации, предварительно усыпляя диэтиловым эфиром. Забор крови осуществляли путем сбора с места разреза для последующего изучения биохимических показателей.

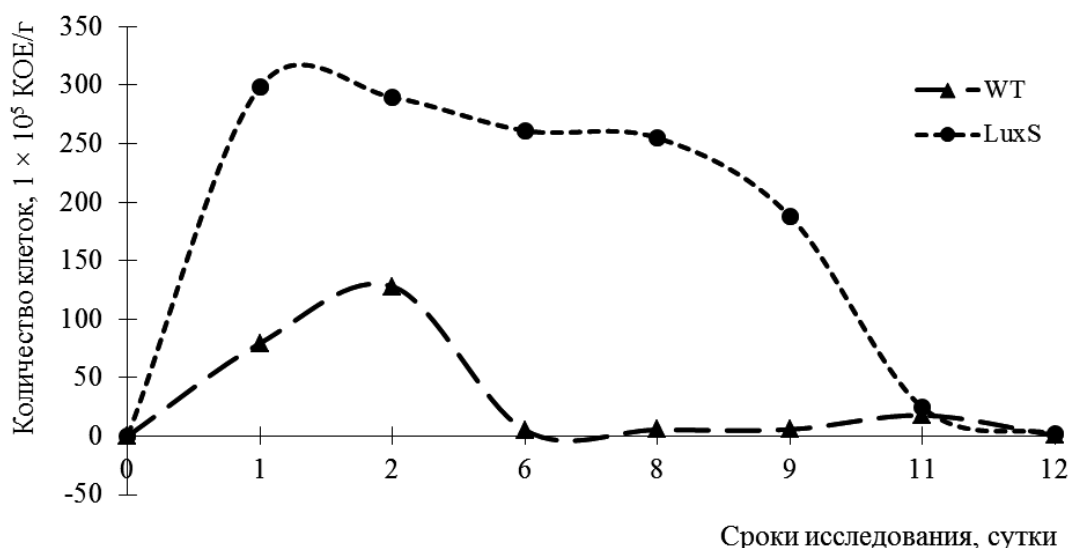
Вскрытие производилось следующим образом. Труп животного переворачивали на спину, лапы растягивали и фиксировали, шерсть передней половины туловища обрабатывали дезинфектантом, делали ножницами продольный разрез вдоль белой линии живота к конечностям. Кожу отпрепаровывали скальпелем. Вскрывали брюшную полость от разреза под линией диафрагмы до лонной кости, заменив инструменты. В качестве материала, содержащего бактерии, из брюшной полости забирали кусочки печени и селезенки.

Отобранные органы помещали в стерильную ступку, тщательно растирали пе-

стиком, добавляли стерильный физиологический раствор и смешивали в гомогенную суспензию. Количество физиологического раствора зависит от взвешенного кусочка органа. Полученную суспензию дозатором помещали на среду ЭНДО и шпателем Дригальского растирали до полного впитывания. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. После этого производили учет результатов выросших колоний. На среде ЭНДО колонии *Salmonella typhimurium* имели вид нежно-розовых колоний.

На первом этапе нашего исследования мы проводили отбор фекалий для бактериологического анализа и делали высевы из разведений на среду Плоскирева.

По данным графика видно, что пиковая концентрация в группе, где применялся штамм *S. typhimurium* 14028S с удаленным геном  $\Delta luxS$  ( $O_2$ ), была достигнута на первый день эксперимента, в группе же, где в качестве инфекционного агента применялся дикий штамм *S. typhimurium* 14028S WT ( $O_1$ ), максимальная концентрация достигалась на вторые сутки исследования. В дальнейшем концентрация в обеих опытных группах снижалась: в группе  $O_1$  минимальная концентрация фиксировалась на шестые сутки, вплоть до 12 дня эксперимента она находилась в пределах минимума; в группе  $O_2$  снижение концентрации было плавным, минимальное ее значение достигалось только на 12 сутки.



Динамика изменения КОЕ в фекалиях экспериментальных животных

Исходя из выше изложенного, можно сделать предположение о том, что в организме лабораторных животных в первые сутки шло активное размножение микроорганизмов с дальнейшей активацией процессов иммунной системы.

Изменение уровня патогенности и вирулентности различных микроорганизмов связано с различными факторами окружающей и внутренней среды макроорганизма, а также обусловлены мутациями уже хорошо изученных штаммов микроорганизмов. В данной работе было рассмотрено влияние на организм дикого *Salmonella typhimurium* 14028S WT и генномодифицированного штаммов

*Salmonella typhimurium* 14028S с удаленным геном  $\Delta luxS$  по средству оценки показателей крови экспериментальных животных, а также на основании выделения микроорганизмов из внутренних органов и фекалий. Проведенные исследования позволили сделать следующий вывод: установлено, что оба исследуемых штамма – *Salmonella typhimurium* 14028S WT и *Salmonella typhimurium* 14028S  $\Delta luxS$  приводят к развитию генерализованной инфекции с максимальным поражающим эффектом на 6 день исследования, о чем свидетельствует выделение вышеперечисленных микроорганизмов из крови, печени, селезенки и фекалий.