

## ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 636.09:614.4:579.842.1/.2:57.063.8

### Ідентифікація бактерій роду *Salmonella* та сероварів *Enteritidis* і *Typhimurium* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ)

Рубленко Н.М.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

✉ Rublenko@biocontrol.com.ua



Рубленко Н.М. Ідентифікація бактерій роду *Salmonella* та сероварів *Enteritidis* і *Typhimurium* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ). Науковий вісник ветеринарної медицини, 2020. № 1. С.21–31.

Rublenko N.M. Identifikacija bakterij rodu *Salmonella* ta serovariv *Enteritidis* i *Typhimurium* metodom polimeraznoi' lancjugovoi' reakcii' v real'nomu chasi (PLR-RCh). Naukovyj visnyk veterynarnoi' medycyny, 2020. № 1. PP. 21–31.

Рукопис отримано: 06.05.2020р.

Прийнято: 15.05.2020р.

Затверджено до друку: 21.05.2020р.

doi: 10.33245/2310-4902-2020-154-1-21-31

У статті наведено результати ідентифікації бактерій роду *Salmonella* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ). Було сконструйовано три пари фланкуючих праймерів та флуоресцентні зонди, які дозволяють одночасно ідентифікувати рід *Salmonella*, а також серовари *Enteritidis* та *Typhimurium* у полімеразній ланцюговій реакції в реальному часі. Оцінку специфічності набору праймерів проводили на штаммах бактерій роду *Salmonella* різних сероварів Національного центру штамів мікроорганізмів (НЦШМ) Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) та на 46 польових штаммах роду *Salmonella*, що були ізольовані від птиці. Для перевірки специфічності праймерів у якості гетерологічних зразків було використано штами *E. Coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 з колекції НЦШМ. Виділення ДНК бактерій проводили з використанням набору «ДНК-сорб Б» (Амплісенс), постановку реакції ПЛР в реальному часі виконували з реагентами «Набору для ПЛР-РЧ» (Синтол) на приладі Bio-rad CFX.

Для оцінки чутливості праймерів було досліджено серію 10-кратних розведень ДНК *S. Typhimurium* та *S. Enteritidis*:  $10^{-1}$ – $10^{-5}$ . Встановлено, що аналітична чутливість праймерів для детекції роду *Salmonella* складає: для *S. Typhimurium* – 0,25 нг/зразок (*Typhimurium*) та *S. Enteritidis* – 0,27 нг/зразок (*Enteritidis*).

У результаті проведених досліджень підтверджено специфічність набору праймерів та високу чутливість. Встановлено відсутність гібридизації праймерів зі зразками ДНК інших видів бактерій, зокрема, відмічено відсутність неспецифічних продуктів реакції. Також встановлено специфічність наборів праймерів для детекції ДНК сероварів *Enteritidis* та *Typhimurium*. За потреби дані набори праймерів можна використовувати для постановки мультиплексного варіанта ПЛР-РЧ, що дозволить одночасно ідентифікувати бактерії роду *Salmonella* та диференціювати серовари *Enteritidis* і *Typhimurium*.

**Ключові слова:** *Salmonella*, бактерії, полімеразна ланцюгова реакція, ДНК, ПЛР у режимі реального часу.

**Постановка проблеми.** Щороку захворюваність на сальмонельоз зростає, що призводить до значних збитків у агропромислових господарствах [1]. Переважно це стосується птахівництва. Зростання поголів'я птахів у промислових господарствах призводить до пропорційного зростання ризику інфікування сальмонелами харчових продуктів [2]. Най-

частіше за контролю виявляють ізоляти сальмонел, що належать до убівітарних сероварів *Enteritidis*, *Typhimurium*, *Nadar*, *Kentucky*, *Infantis*, *Heidelberg* [3].

Циркуляція сальмонел в межах господарств промислового птахівництва спричинена особливістю перебігу інфекції серед поголів'я. Інфікована птиця з безсимптомним перебігом

інфікує воду, корми, предмети догляду та підстилку [4].

Додатковим чинником, який ускладнює контроль та можливі шляхи ліквідації сальмонельозу є значна антигенна різноманітність збудника, здатність виробляти резистентність до антибактеріальних препаратів та чинники, що підвищують патогенність окремих популяцій [5].

На сьогодні для контролю над сальмонельозною інфекцією розроблено програми, що дозволяють охопити малі приватні господарства та великі промислові підприємства з виробництва м'яса птиці та яєць і яєчних продуктів.

В Україні з 2016 року діє Інструкція з профілактики та ліквідації сальмонельозу птиці [6]. В країнах ЄС контроль здійснюють відповідні заклади ветеринарної медицини та референс-лабораторії з сальмонельозу. Відповідно до цих інструкцій, постановку діагнозу здійснюють за умови виділення чистої живої культури бактеріологічними методами [7].

Додатковими методами є імуноферментні та молекулярно-біологічні. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі є одним із найбільш перспективних методів. Основна відмінність цієї модифікації методу – збільшена чутливість, специфічність та скорочення часу до отримання результату [8–9].

#### Аналіз останніх досліджень і публікацій.

У загальній структурі патології птиці сальмонела має особливе значення, оскільки через високу антигенну різноманітність може спричинювати як спалахи захворюваності у господарствах, наслідком яких є високий падіж, так і субклінічний інфекційний процес [10]. При цьому значно знижується продуктивність птиці та відбувається контамінація м'яса і яєць [11].

Номенклатура антигенної структури сальмонел періодично оновлюється Референтним центром з дослідження сальмонел BOO3 – WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Відповідно до останньої редакції, що була опублікована у 2007 році, рід *Salmonella* включає 2579 сероварів. Серед них 22 відносять до виду *bongori*, а 2557 – до виду *enterica* [12]. Серовари виду *bongori* найчастіше виділяють від холонокровних тварин, хоча вони також можуть бути збудниками сальмонельозу у ссавців та людей. Щодо інфікування птиці сальмонелами виду *bongori* у науковій літературі є мало даних, описані лише поодинокі випадки виділення сальмонел виду *bongori* з курячих яєць та від синантропних птахів [13; 14]. З цього можна зробити висновок, що *bongori* не має значного впливу на епізоотичний процес у птиці.

Серовари Pullorum та Gallinarum найчастіше спричиняють захворювання у курчат, індиків та

фазанів, рідше – у перепелів, качок, цесарок та павичів [15]. Смертність може досягати 100 %. Це залежить насамперед, від віку птиці, вгодованості, умов утримання та наявності супутніх інфекцій, оскільки відомо, що за несприятливих умов знижується резистентність сальмонелозів [16]. В Україні збудники пулорозу і тифу птиці досі є одними з найбільш поширених ізолятів сальмонел, які виділяють за моніторингу [17].

Серовари Enteritidis та Typhimurium є часково адаптованими збудниками. Зумовлюють сальмонельоз у молодяку птиці, а в дорослого поголів'я перебігають субклінічно [6]. Однак у інфікованої дорослої птиці відмічають зниження продуктивності та інтенсивну колонізацію кишечника, внаслідок чого відбувається контамінація підстилки, кормів та води фекаліями, що містять сальмонелу [16].

Таким чином, небезпеку для птахівництва становлять як адаптовані серовари, які спричиняють системну інфекцію у птиці, так і неадаптовані – збудники хронічної інфекції. У першому випадку виникає висока смертність поголів'я птиці, зменшення продуктивності, що наносить значні економічні збитки. Насамперед це витрати на протиепізоотичні заходи, що включають дезінфекцію, оновлення стад і вакцинацію. Адаптовані та частково адаптовані серовари становлять небезпеку в першу чергу для харчової продукції. Тому моніторинг епізоотичної ситуації в промислових господарствах є першою ланкою у процесі забезпечення ветеринарно-санітарного контролю.

Виділення чистої культури – еталонний метод діагностики бактеріальних інфекцій, який є основним, хоча і може доповнюватися імунологічними та молекулярно біологічними методами [6, 7]. Початкові етапи бактеріологічної діагностики сальмонельозу завжди включають попереднє збагачення дослідного зразка на забуференій пептонній воді та селективне збагачення на середовищах, що пригнічують ріст бактерій *Proteus spp.* і грампозитивної мікрофлори. Після цього дослідні зразки культивують на селективних і диференційних хромогенних середовищах з наступним підтвердженням роду *Salmonella* та визначенням серовару у реакції аглютинації за схемою Вайта-Кауфмана [12].

Однак у бактеріологічного методу є свої недоліки:

1) значна тривалість у часі. Кожен етап – преселективне збагачення, селективне накопичення та диференціація – займає не менше 18 годин [18];

2) трудомісткість. Метод потребує використання великої кількості посуду, середовищ та тривалої роботи фахівців-мікробіологів;

3) необхідність високої концентрації збудника, оскільки за його невеликої кількості у відібраному зразку не завжди вдається виділити культуру, що призводить до хибно негативних результатів.

З розвитком молекулярної біології значного поширення у діагностиці та впровадження у рутинну практику набув метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). За допомогою ПЛР можливо виявити генетичний матеріал збудника у низьких концентраціях, особливо це стосується модифікації ПЛР у реальному часі (далі – ПЛР-РЧ), яка крім ідентифікації дозволяє провести кількісний аналіз.

ПЛР-РЧ можна використовувати як для детекції однієї мішені, так і для мультиплексних реакцій [19, 20]. Так, у ПЛР-РЧ можна одночасно підтвердити належність бактерії до роду *Salmonella* та диференціювати її відповідно до серовару – Enteritidis та Typhimurium.

**Мета роботи** – провести ідентифікацію ДНК ізолятів роду *Salmonella* в полімеразній ланцюговій реакції у реальному часі та підтвердити серовари Enteritidis і Typhimurium.

**Матеріал і методи дослідження.** Виділення препаратів ДНК виконували за допомогою комерційного набору «ДНК-сорб» (Ампі-сенси), згідно з інструкціями виробників. Концентрацію препаратів ДНК визначали спектрофотометрично («NanoDrop 1000C»).

Для постановки реакції використовували набір реагентів (Синтол) для ПЛР в реальному часі. Реакційна суміш складалася з 10х буфера, 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, ДНК-полімерази SynTaq (5 О/мкл), суміші dNTP у концентрації 2,5 мМ, води, 10 пмоль/мкл фланкуючих праймерів та 10 пмоль/мкл флуоресцентного зонду. У пробірці об'ємом 0,2 мл додавали 22 мкл реакційної суміші та 3 мкл ДНК.

За результатами досліджень було сконструйовано 3 пари праймерів та зонди для ідентифікації роду *Salmonella*, сероварів *S. Typhimurium* та *S. Enteritidis*. Аналіз гомології нуклеотидних послідовностей та підбір праймерів проводили з використанням програмного забезпечення Vector NTI™ v.11.0.1 (Invitrogen, США). Зонди було синтезовано за технологією TaqMan [21].

Реакцію ампліфікації проводили на приладі Bio-rad CFX (США) з використанням наступного термопрофілю:

1: 95,0 °C 5:00

2: 95,0 °C 0:15

3: 60,0 °C 0:50

Флуоресценцію вимірювали за каналами Cy5 (*S. Typhimurium*), HEX (*S. Enteritidis*) та FAM (*Salmonella spp.*). Облік результатів аналізу проводили на основі наявності або відсутності перетину кривої флуоресценції з пороговою лінією (що відповідає наявності/відсутності значення порогового циклу Ct у відповідній графі в таблиці результатів).

Інтерпретацію результатів ПЛР-РЧ проводили відповідно до таблиці 2.

Як референтні зразки використовували ДНК штамів з Колекції Національного центру штамів (НЦШМ) Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ): *S. Adabraka* 1, *S. Abortusovis* 372, *S. Typhimurium* 371, *S. Typhimurium* 144, *S. Typhimurium* B, *S. Typhimurium* 3, *S. Enteritidis* P1, *S. Enteritidis* M, *S. Pullorum* K, *S. Choleraesuis* 9, *S. Choleraesuis* 370, *S. Dublin* 373.

ДНК штамів *E. Coli* ATCC25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 з Колекції НЦШМ були використані як гетерологічні зразки.

Таблиця 1 – Послідовності олігонуклеотидних праймерів та зондів, використаних у дослідженні

| Праймер    | 55'        | Послідовність              | 3'          | Tm      | %GC  |                        |
|------------|------------|----------------------------|-------------|---------|------|------------------------|
| dSTY-F     |            | GCTGCTACAACCACCGAAAAC      | -           | 54,8 °C | 60   | Typhimurium            |
| dSTY-R     |            | GATACGGCTACGGGCAGAAAG      | -           | 53,9 °C | 60   |                        |
| dSTY-proba | <b>Cy5</b> | CAACCTGGGCAACACCTAAACAAC   | <b>RTQ2</b> | 62,3 °C | 50   |                        |
| dSE-F      | -          | CGTTATTGCCGAGGTGGATT       | -           | 54,0 °C | 50   | Enteritidis            |
| dSE-R      | -          | TAAGGGGAGAGGGAAAGATGG      | -           | 53,8 °C | 52,4 |                        |
| dSE-proba  | <b>HEX</b> | TGAGCCAAAAACATATCCCATCCATT | <b>BHQ2</b> | 60,4 °C | 38,5 |                        |
| dSsp-F     | -          | CTGTTTACCGGGCATACCATC      | -           | 53,5 °C | 52,4 | <i>Salmonella spp.</i> |
| dSsp-R     | -          | TCGCACTGAATATCGTACTGGC     | -           | 54,4 °C | 50   |                        |
| dSproba    | <b>FAM</b> | CAAAACCCACCGCCAGGCTATCG    | <b>BHQ1</b> | 65 °C   | 60,9 |                        |

Таблиця 2 – Таблиця значень, що використовуються для обліку результатів

| Результат  | Значення «Ct» по каналу «Cy5» | Значення «Ct» по каналу «HEX» | Значення «Ct» по каналу «FAM» |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Позитивний | ≤38                           | ≤38                           | ≤38                           |
| Сумнівний  | >38                           | >38                           | >38                           |
| Негативний | ≥ 40                          | ≥ 40                          | ≥ 40                          |

Статистичну обробку результатів (обчислення стандартного відхилення SD) проводили за допомогою програми Excel (Microsoft 365) і "Bio-Rad CFX Manager 2.1" (v. 2.1.1022.0523).

**Результати дослідження.** Об'єктом дослідження були 12 штамів *S. enterica* з колекції НЦШМ та 46 польових штамів *Salmonella enterica*: *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Virchow, 3 польових штами *Salmonella* Infantis, 4 *Salmonella* Gallinarum, 14 *Salmonella* Typhimurium та 21 *Salmonella* Enteritidis.

Для розрахунків було відібрано 97 повногеномних послідовностей з електронних баз даних: GenBank (США), EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека) та DDBJ (Японська база даних). Після вирівнювання та аналізу гомології нуклеотидних послідовностей було обрано можливі таргетні гени для ПЛР в реальному часі.

Як таргетний ген для *Salmonella spp.* обрано ген *invA*. Для ідентифікації серовару Enteritidis ми обрали ген *fliC*, який кодує джгутиковий антиген 1 фази, специфічний для даного серовару [22, 23]. Таргетним геном для ідентифікації серовару Enteritidis став ген гіпотетичного білка, що містить домен DUF1391. Специфічність фланкуючих праймерів перевіряли у програмі BLAST 2.0 (NCBI, США).

Облік та інтерпретацію результатів ПЛР-РЧ виконували за наявності або відсутності перетину кривої флуоресценції з встановленою на відповідному рівні пороговою лінією (Ct). Зразок вважали позитивним, якщо значення Ct становило  $\leq 38$ , за відсутнього значення Ct негативного контролю. Зразок вважали негативним, якщо значення Ct були відсутні.

Після оптимізації умов реакції, усі варіанти були перевірені на діагностичну специфічність, яку визначали за критерієм нездатності праймерів гібридуватись з ДНК гетерологічних зразків, про що свідчила відсутність будь-яких значень у цих пробах за детекції флуоресценції на відповідному каналі. Специфічність складала 100 % (табл. 3, рис. 1).

У негативних зразках та зразках із сторонніми збудниками були відсутні значення порогового циклу Ct, а в позитивних зразках, що містили ДНК *Salmonella spp.*, Ct не перевищувало встановлених меж для позитивного значення ( $\leq 38$ ), що свідчить про специфічність щодо виявлення ДНК *Salmonella spp.* Реакцію проводили у трьох повторях та обчислювали стандартне відхилення (SD). У таблицях 3 і 5 наведено середнє значення Ct та SD.

Аналітичну чутливість олігонуклеотидних праймерів dSsp-F/dSsp-R/ dS-proba визначали шляхом тестування серії 10-кратних розведень ДНК паралельно для *S. Typhimurium* та *S. Enteritidis*. З цією метою спектрофотометрично було визначено початкову концентрацію ДНК в зразку, яка становила 20,5 нг (*Typhimurium*) та 27,0 нг (*Enteritidis*) (рис. 3, табл. 4).

Межею виявлення (limit of detection, LOD) вважали останнє розведення ДНК, за якого спостерігається збільшення росту кривої флуоресценції, а отримане значення Ct по каналу FAM становить  $\leq 38$ .

Отримані результати свідчать, що аналітична чутливість праймерів dSsp-F/dSsp-R/dS-proba до ДНК бактерій роду *Salmonella* складає: для *S. Typhimurium* – 0,25 нг/зразок; *S. Enteritidis* – 0,27 нг/зразок (табл. 4).

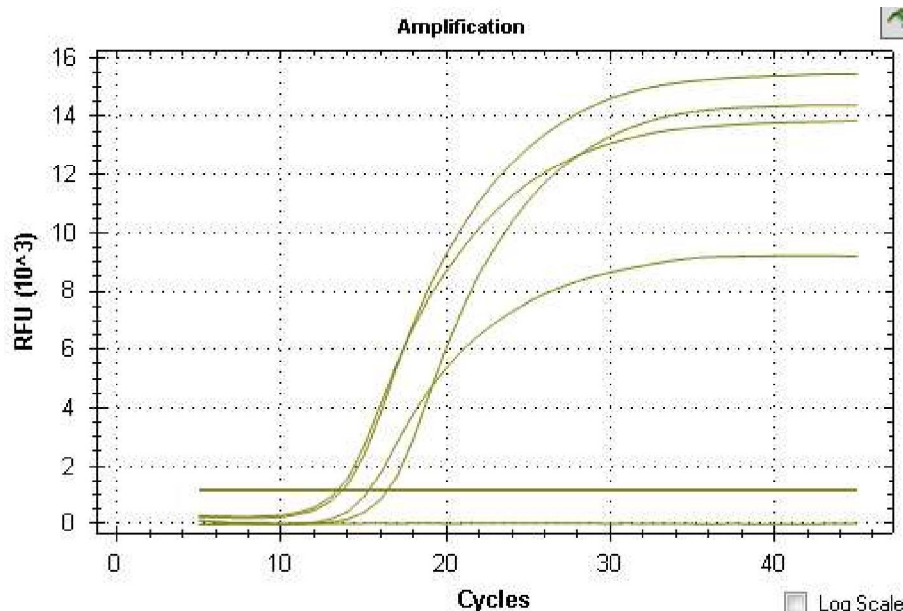


Рис. 1. Результат перевірки в ПЛР-РЧ праймерів, специфічних до *Salmonella spp.*



Таблиця 3 – Результати перевірки специфічності праймерів (за каналом FAM) до штамів *Salmonella enterica* різних сероварів та до гетерологічних зразків

| Штам                                     | Середнє значення Ct | SD   | Результат, щодо наявності ДНК <i>Salmonella spp</i> |
|------------------------------------------|---------------------|------|-----------------------------------------------------|
| S. Adabraka 1                            | 15,82               | 0,28 | Позитивний                                          |
| S. Abortusovis 372                       | 16,25               | 0,23 | Позитивний                                          |
| S. Typhimurium 371                       | 15,41               | 0,43 | Позитивний                                          |
| S. Typhimurium 144                       | 15,44               | 0,43 | Позитивний                                          |
| S. Typhimurium B                         | 16,15               | 0,15 | Позитивний                                          |
| S. Typhimurium 3                         | 17,13               | 0,16 | Позитивний                                          |
| S. Dublin 373                            | 16,15               | 0,21 | Позитивний                                          |
| S. Enteritidis P1                        | 16,95               | 0,09 | Позитивний                                          |
| S. Enteritidis M                         | 15,84               | 0,34 | Позитивний                                          |
| S. Choleraesuis 9                        | 16,90               | 0,10 | Позитивний                                          |
| S. Choleraesuis 370                      | 16,04               | 0,46 | Позитивний                                          |
| S. Gallinarum Pullorum K                 | 17,88               | 0,30 | Позитивний                                          |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922                | -                   | -    | Негативний                                          |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778        | -                   | -    | Негативний                                          |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19112 | -                   | -    | Негативний                                          |
| Негативний контроль                      | -                   | -    | Негативний                                          |
| S. Enteritidis DN1                       | 16,17               | 0,08 | Позитивний                                          |
| S. Enteritidis DN3                       | 17,10               | 0,11 | Позитивний                                          |
| S. Enteritidis N6                        | 23,64               | 0,45 | Позитивний                                          |
| S. Enteritidis 2679                      | 19,61               | 0,18 | Позитивний                                          |
| S. Enteritidis GT                        | 16,28               | 0,46 | Позитивний                                          |
| S. Enteritidis 9                         | 18,34               | 0,15 | Позитивний                                          |
| S. Enteritidis 15                        | 19,06               | 0,05 | Позитивний                                          |
| S. Enteritidis G22                       | 19,05               | 0,02 | Позитивний                                          |
| S. Enteritidis 10                        | 25,25               | 0,07 | Позитивний                                          |
| S. Enteritidis K13                       | 17,12               | 0,17 | Позитивний                                          |
| S. Typhimurium PN                        | 15,55               | 0,27 | Позитивний                                          |
| S. Typhimurium 000173                    | 16,87               | 0,42 | Позитивний                                          |
| S. Typhimurium 771                       | 17,75               | 0,37 | Позитивний                                          |
| S. Typhimurium 16                        | 14,79               | 0,35 | Позитивний                                          |
| S. Typhimurium VM1                       | 18,75               | 0,44 | Позитивний                                          |
| S. Typhimurium VM2                       | 17,19               | 0,16 | Позитивний                                          |
| S. Typhimurium VM3                       | 17,98               | 0,07 | Позитивний                                          |
| S. Typhimurium VM4                       | 15,97               | 0,12 | Позитивний                                          |
| S. Typhimurium VM5                       | 17,63               | 0,29 | Позитивний                                          |
| S. Gallinarum 15                         | 16,75               | 0,35 | Позитивний                                          |
| S. Gallinarum 25                         | 16,23               | 0,21 | Позитивний                                          |
| S. Gallinarum N1                         | 15,99               | 0,38 | Позитивний                                          |
| S. Gallinarum 31                         | 18,12               | 0,09 | Позитивний                                          |
| S. Hadar                                 | 18,93               | 0,15 | Позитивний                                          |
| S. Kentucky                              | 16,74               | 0,19 | Позитивний                                          |
| S. Infantis00317                         | 16,67               | 0,43 | Позитивний                                          |
| S. Infantis21                            | 18,94               | 0,07 | Позитивний                                          |
| S. Virchow L116                          | 16,53               | 0,43 | Позитивний                                          |
| S. Virchow 8v                            | 18,19               | 0,16 | Позитивний                                          |

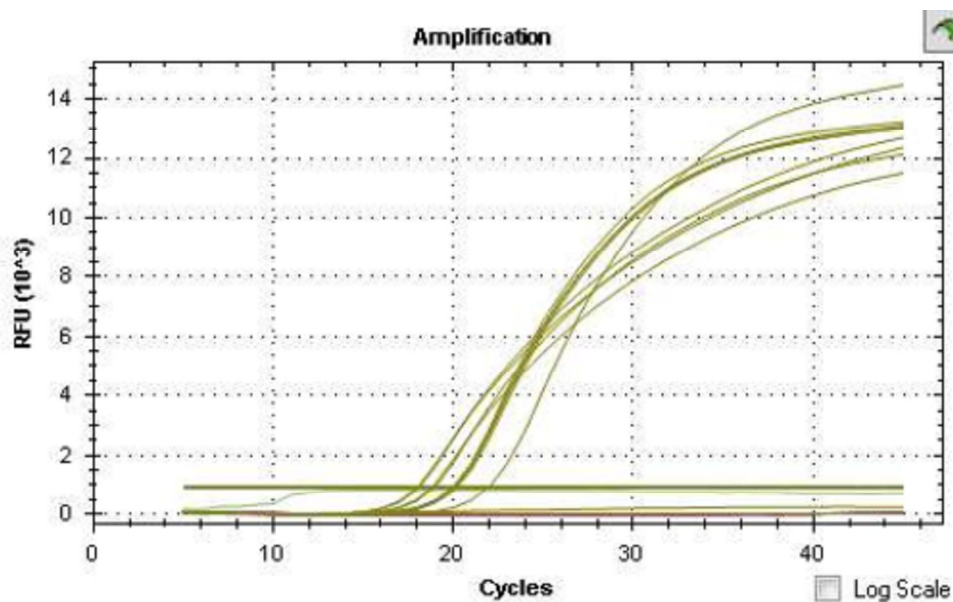


Рис. 2. Перевірка в ПЛР-РЧ специфічності праймерів dSsp-F/dSsp-R/dSp-proba до різних сероварів бактерій роду *Salmonella*.

Таблиця 4 – Визначення аналітичної чутливості праймерів dSsp-F/dSsp-R/dS-proba до ДНК бактерій роду *Salmonella*

| № | Розведення ДНК ( <i>S. Typhimurium</i> ) | Значення Ct за каналом FAM ( <i>S. Typhimurium</i> ) | Розведення ДНК ( <i>S. Enteritidis</i> ) | Значення Ct за каналом HEX ( <i>S. Enteritidis</i> ) |
|---|------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 1 | 20,5 нг                                  | 21,03                                                | 27,0 нг                                  | 20,20                                                |
| 2 | $1,0 \times 10^{-1}$                     | 23,66                                                | $1,0 \times 10^{-1}$                     | 23,98                                                |
| 3 | $1,0 \times 10^{-2}$                     | 27,81                                                | $1,0 \times 10^{-2}$                     | 27,16                                                |
| 4 | $1,0 \times 10^{-3}$                     | 30,93                                                | $1,0 \times 10^{-3}$                     | 30,24                                                |
| 5 | $1,0 \times 10^{-4}$                     | 34,09                                                | $1,0 \times 10^{-4}$                     | 34,22                                                |
| 6 | $1,0 \times 10^{-5}$                     | 36,95                                                | $1,0 \times 10^{-5}$                     | 36,82                                                |
| 7 | K <sub>Typh</sub> (-)                    | -                                                    | K <sub>Ent</sub> (-)                     | -                                                    |

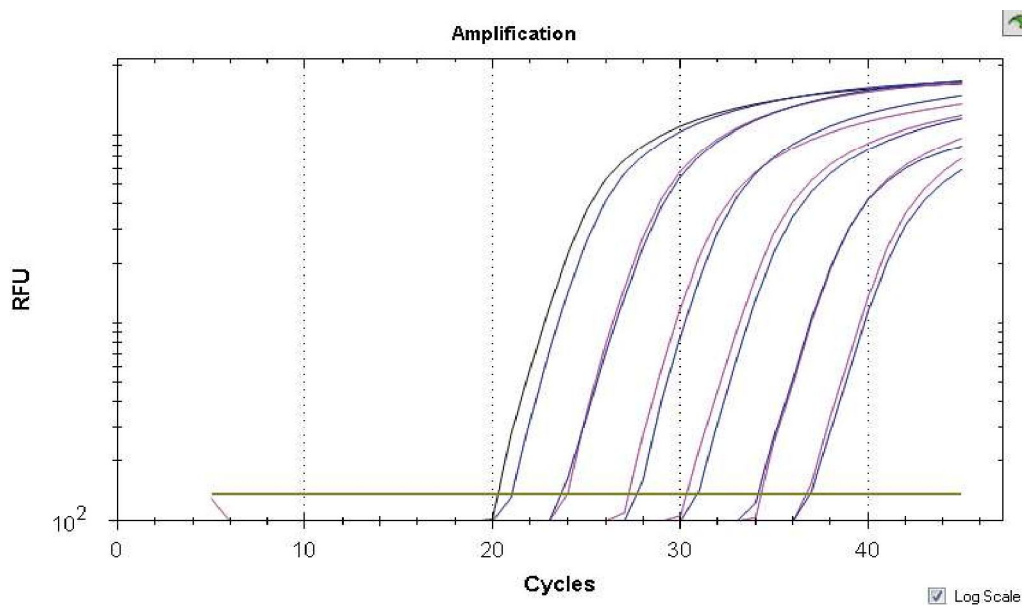


Рис. 3. Перевірка аналітичної чутливості праймерів dSsp-F/dSsp-R/dS-proba до ДНК бактерій роду *Salmonella*.

Таблиця 5 – Визначення специфічності праймерів сероварів *S. Enteritidis* та *S. Typhimurium*

| Зразок                | FAM ( <i>Salmonella spp</i> ) |      | HEX (Enteritidis) |      | Cy5(Typhimurium) |          |
|-----------------------|-------------------------------|------|-------------------|------|------------------|----------|
|                       | Ct середнє                    | SD   | Ct середнє        | SD   | Ct середнє       | SD       |
| S. Enteritidis DN1    | 16,17                         | 0,08 | 25,10             | 0,12 | -                | -        |
| S. Enteritidis DN3    | 17,10                         | 0,11 | 21,60             | 0,25 | -                | -        |
| S. Enteritidis GT     | 16,28                         | 0,46 | 30,47             | 0,26 | -                | -        |
| S. Enteritidis 9      | 18,34                         | 0,15 | 35,64             | 0,37 | -                | -        |
| S. Enteritidis P81    | 18,86                         | 0,23 | 21,50             | 0,47 | -                | -        |
| S. Enteritidis 4v     | 35,03                         | 0,15 | 33,85             | 0,18 | -                | -        |
| S. Gallinarum 15      | 16,75                         | 0,35 | -                 | -    | -                | -        |
| S. Gallinarum N1      | 15,99                         | 0,38 | -                 | -    | -                | -        |
| S. Gallinarum 31      | 18,12                         | 0,09 | -                 | -    | -                | -        |
| S. Typhimurium PN     | 15,55                         | 0,27 | -                 | -    | 20,46667         | 0,352184 |
| S. Typhimurium VM1    | 18,75                         | 0,44 | -                 | -    | 21,95667         | 0,295691 |
| S. Typhimurium S1     | 18,96                         | 0,19 | -                 | -    | 37,45333         | 0,240069 |
| S. Typhimurium L1     | 27,02                         | 0,14 | -                 | -    | 35,66            | 0,308058 |
| S. Typhimurium Pg1    | 31,33                         | 0,31 | -                 | -    | 32,09            | 0,291033 |
| S. Enteritidis L2     | 22,13                         | 0,17 | 23,30             | 0,41 | -                | -        |
| S. Enteritidis PN     | 18,87                         | 0,36 | 29,07             | 0,10 | -                | -        |
| S. Enteritidis K13    | 17,12                         | 0,17 | 21,22             | 0,14 | -                | -        |
| S. Infantis PN        | 22,74                         | 0,48 | -                 | -    | -                | -        |
| S. Virchow L116       | 30,79                         | 0,38 | -                 | -    | -                | -        |
| S. Typhimurium 000173 | 16,87                         | 0,42 | -                 | -    | 31,12            | 31,17    |
| S. Typhimurium 771    | 17,75                         | 0,37 | -                 | -    | 33,15            | 34,01    |
| S. Typhimurium 16     | 14,79                         | 0,35 | -                 | -    | 26,24            | 26,22    |
| S. Typhimurium VM2    | 17,19                         | 0,16 | -                 | -    | 25,18            | 25,98    |
| S. Typhimurium VM 3   | 17,98                         | 0,07 | -                 | -    | 19,33            | 19,65    |
| S. Typhimurium VM 4   | 15,97                         | 0,12 | -                 | -    | 27,29            | 27,24    |
| S. Typhimurium VM 5   | 17,63                         | 0,29 | -                 | -    | 18,43            | 18,54    |
| S. Typhimurium M1003  | 22,30                         | 0,21 | -                 | -    | 29,15            | 29,33    |
| S. Typhimurium PgA2   | 21,38                         | 0,17 | -                 | -    | 32,12            | 32,57    |
| S. Enteritidis N6     | 23,64                         | 0,45 | 32,05             | 0,08 | -                | -        |
| S. Enteritidis 2679   | 19,61                         | 0,18 | 34,06             | 0,10 | -                | -        |
| S. Enteritidis 15     | 18,26                         | 0,42 | 23,25             | 0,08 | -                | -        |
| S. Enteritidis G22    | 19,05                         | 0,02 | 21,50             | 0,47 | -                | -        |
| S. Enteritidis 6PR    | 21,59                         | 0,37 | 30,61             | 0,42 | -                | -        |
| S. Enteritidis S0822  | 22,56                         | 0,15 | 27,07             | 0,07 | -                | -        |
| S. Enteritidis S1     | 19,85                         | 0,19 | 27,40             | 0,24 | -                | -        |
| S. Enteritidis T16    | 19,47                         | 0,48 | 19,03             | 0,04 | -                | -        |
| S. Enteritidis P18    | 23,37                         | 0,34 | 32,91             | 0,23 | -                | -        |
| S. Enteritidis 4      | 27,20                         | 0,03 | 26,71             | 0,41 | -                | -        |
| S. Enteritidis PgA    | 28,28                         | 0,33 | 23,24             | 0,28 | -                | -        |
| S. Enteritidis 10     | 25,25                         | 0,07 | 25,74             | 0,35 | -                | -        |

З метою оцінки специфічності праймерів, що диференціюють серотипи *S. Enteritidis* і *S. Typhimurium*, були використані польові штами та штами НЦШМ (табл. 5).

За необхідності праймери для *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* та *Salmonella spp.* можуть бути використані в мультиплексному варіанті ПЛР-РЧ, оскільки відрізняються за

розміром фрагменту та не утворюють вторинних структур між собою (рис. 4).

**Обговорення.** Метод полімеразної ланцюгової реакції є перспективним у лабораторній діагностиці бактеріальних інфекцій, зокрема,

варіальне інфікування [26]. За даними EFSA серовар Enteritidis є домінуючим у стадах курей-несучок, і його відсоток зростає з 2016 [27]. У 2017 захворюваність серед людей зростає до 91662 випадків, серед яких у 36,8 % ін-

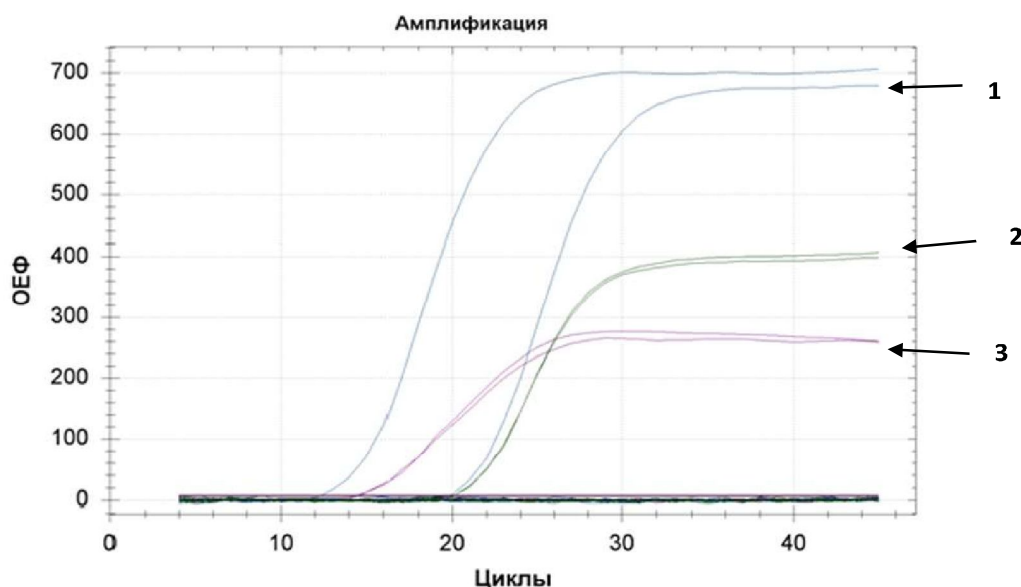


Рис. 4. Використання праймерів в мультиплексному варіанті ПЛР-РЧ:  
1 – праймери для *Salmonella spp*; 2 – праймери для *S. Typhimurium*;  
3 – праймери для *S. Enteritidis*.

через швидкість отримання результатів та високу чутливість методу. ПЛР використовують не лише для ідентифікації геному збудника, але, в деяких випадках, і для підтвердження результатів виділення чистої культури бактеріологічним методом та для диференціації вакцинних і польових штамів [24, 25]. Залежно від мети і завдань використовують різні модифікації, найчастіше – полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі.

У даному дослідженні проводили підтвердження роду *Salmonella* та сероварів Enteritidis і Typhimurium у ПЛР-РЧ. Було встановлено, що специфічність даного набору праймерів становить 100 %. Окрім того дані праймери можуть бути використані також і в мультиплексному варіанті, що дозволяє одночасно проводити ідентифікацію роду *Salmonella*, а також сероварів Enteritidis та Typhimurium.

Дані серовари є одними з найбільш поширених. В Україні протягом 2015–2018 років їхня частка становила 35,2 % серед усіх сальмонел, виділених з біологічного та патологічного матеріалу тварин і птиці [17]. Варто зазначити, що ці серовари відносять до неадаптованих, оскільки вони є патогенними для різних видів, зокрема у дорослого поголів'я птиці інфекція перебігає безсимптомно та спричиняє транс-

фекція була спричинена споживанням курячих яєць [27]. Тому існує необхідність ретельного контролю циркуляції нетифоїдних сероварів у птахівництві для безпеки харчової продукції.

#### Висновки.

1. Доведено специфічність відповідних пар фланкуючих праймерів та зондів до роду *Salmonella* та сероварів Enteritidis і Typhimurium.

2. Встановлено, що аналітична чутливість праймерів dSsp-F/dSsp-R/ dSsp-probe до ДНК бактерій роду *Salmonella* складає: для *S. Typhimurium* – 0,25 нг/зразок; для *S. Enteritidis* – 0,27 нг/зразок.

3. За результатами статистичної обробки отриманих даних встановлено високу збіжність, оскільки при обробці результатів ПЛР-РЧ, проведеної у трьох повторах, статистично значимих розбіжностей не виявлено ( $SD \leq 0,5$ ).

#### Відомості про дотримання біоетичних норм.

Тварин для дослідження не використовували.

**Відомості про конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Стегній Б.Т., Медвідь К.О., Музика Д.В., Рула О.М. Динаміка формування імунної відповіді у курей після щеплення інактивованою бівалентною вакциною проти сальмонельозу птиці. Ветеринарна біотехнологія. 2018. Вип. 32. № 1. С. 265–271.



2. Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies/ L. Merino et al. Food Research International. 2019. Vol. 119. No. July. C. 530–540. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.024>.
3. Andreoletti O., Budka H., Buncic S. Quantitative estimation of the impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in breeding hens of *Gallus gallus*. EFSA Journal. 2009. Vol. 7. No. 4. C. 1–68. Doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1036>.
4. Інфекційні захворювання тварин / Бессарабов и др.; под ред. А. А. Сидорчука. Москва: КолосС, 2007. 671 с.
5. Swayne D. E. Diseases of poultry, John Wiley & Sons, Inc. 2013. 1423 p.
6. Інструкція з профілактики та ліквідації сальмонельозу птиці: Наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України 19.09.2016 № 310. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/z1344-16>.
7. Prevention, detection and control of *Salmonella* in poultry / Terrestrial Animal Health Code. Paris. Office International des Epizooties (OIE). 2015.
8. Rapid detection of *Salmonella* in poultry environmental samples using real-time PCR coupled with immunomagnetic separation and whole genome amplification / J.Y. Hyeon et al. Poultry Science. 2019. Vol. 98. No. 12. P. 6973–6979. Doi:<https://doi.org/10.3382/ps/pez425>.
9. Selenite enrichment broth to improve the sensitivity in molecular diagnostics of *Salmonella*/ M.D. Boer et al. Journal of Microbiological Methods. 2019. Vol. 157. No. November 2018. P. 59–64. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.12.018>.
10. Circulation dynamics of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Gallinarum* biovar *Gallinarum* in a poultry farm infested by *Dermanyssus gallinae*/ N. Pugliese et al. Medical and Veterinary Entomology. 2019. Vol. 33, No. 1. P. 162–170. Doi:<https://doi.org/10.1111/mve.12333>.
11. Small non-coding RNA STnc640 regulates expression of *fimA* fimbrial gene and virulence of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*/ X. Meng et al. BMC veterinary research. 2019. Vol. 15. No. 1. 319 p. Doi:<https://doi.org/10.1186/s12917-019-2066-7>.
12. Grimont P.A., Weill F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Paris, France: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 2007.
13. *Salmonella bongori* 48:z35:- In migratory birds, Italy/ M. Foti et al. Emerging Infectious Diseases. 2009. Vol. 15, No. 3. P. 502–503. Doi:<https://doi.org/10.3201/eid1503.080039>.
14. Characterization of Antibiotic Resistant *Salmonella* spp Isolated from Chicken Eggs of Dhaka City/ M.M. Ahmed et al. Journal of Scientific Research. 2010. Vol. 3. No. 1. 191 p. Doi:<https://doi.org/10.3329/jsr.v3i1.6109>.
15. Shivaprasad, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. OIE Revue Scientifique et Technique. 2000. Vol. 19. No. 2. P. 405–424. Doi:<https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1222>.
16. Каришева, А. Ф. "Спеціальна епізоотологія: підручник." Київ: Вища освіта. 2002. 703 с.
17. Поширення сальмонельозу тварин та птиці в Україні у 2015–2018 роках/ І.В. Галка та ін. Ветеринарна біотехнологія. 2019. Том. 35. С. 22–29. Doi:<https://doi.org/10.31073/vet>.
18. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety / K.M. Lee et al. Food Control. 2015. Vol. 47. P. 264–276. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>.
19. Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw shrimp/ Z. Zhang et al. Food Control. 2015. Vol. 51. P. 31–36. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.007>.
20. Multiplex real-time PCR and culture methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* Thompson in strawberries, a lettuce mix and basil/ S. Delbeke et al. International Journal of Food Microbiology. 2015. Vol. 193. P. 1–7.
21. Jia Y. Chapter 3 – Real-Time PCR: Methods in Cell Biology. Elsevier, 2012. P. 55–68. Doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405914-6.00003-2>.
22. Transcriptional and translational control of the *Salmonella* *fliC* gene/ P. Aldridge et al. Journal of Bacteriology. 2006. Vol. 188. No. 12. P. 4487–4496. <https://doi.org/10.1128/JB.00094-06>.
23. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by selective amplification of *fliC*, *fliB*, *iroB*, *invA*, *rflB*, STM2755, STM4497 genes by polymerase chain reaction in a monoplex and multiplex format/ M. Shanmugasundaram et al. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2009. Vol. 25. No. 8. P. 1385–1394. Doi:<https://doi.org/10.1007/s11274-009-0025-3>.
24. Simultaneous Detection and Differentiation between Wild-Type and Vaccine Measles Viruses by a Multiplex Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay/ K. Pabbaraju et al. Journal of clinical microbiology. 2019. Vol. 57. No. 4. P. 1–9. Doi:<https://doi.org/10.1128/JCM.01828-18>.
25. A TaqMan probe-based real-time PCR to differentiate porcine epidemic diarrhea virus virulent strains from attenuated vaccine strains/ J. Liu et al. Molecular and Cellular Probes. 2019. Vol. 45. No. April. P. 37–42. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.04.003>.
26. Rukambile E., Alders R. Infection, colonization and shedding of *Campylobacter* and *Salmonella* in animals and their contribution to human disease: A review. 2019. No. June 2018. P. 1–17.
27. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017 EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. EFSA Journal. 2018. Vol. 16(12):5500. 262 p. Doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>

## REFERENCES

1. Stegnij B.T., Majboroda O.V., Medvid' K.O., Muzika D.V., Rula O. M. (2018). Dinamika formuvannja imunnoi vidpovidi u kurej pislja shheplennja inaktivovanoju bivalentnoju vakcinoju proti sal'monel'ozu ptici' [Dynamics of formation of immune response in chickens after vaccination with inactivated bivalent vaccine against avian salmonellosis]. Veterinarna biotekhnologija [Veterinary biotechnology]. Vol. 32(1), pp. 265–271.
2. Merino, L., Procura, F., Trejo, F. M. (2019). 'Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies', Food Research International, 119(July), pp. 530–540. Available at:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.024>.

3. Andreoletti, O., Budka, H., Buncic, S. (2009). 'Quantitative estimation of the impact of setting a new target for the reduction of Salmonella in breeding hens of Gallus gallus', EFSA Journal. Vol. 7, no. 4, pp. 1–68. Available at: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1036>.
4. Bessarabov, B.F., Vashutin, A.A., Voronin, E.S. (2007). Infekcionnye bolezni zhivotnyh/Pod red. AA Sidorchuka [Infectious diseases of animals / Bessarabs and others; under the editorship of A.A. Sidorchuk]. Moscow: KolosS, 671 p.
5. Swayne, D. E. (2013). Diseases of poultry. John Wiley & Sons. 1423 p.
6. Instrukcija z profilaktiki ta likvidacii sal'monel'ozu ptici, zatverdzhena Ministerstvom agrarnoi politiki ta prodovol'stva Ukraini 19.09.2016 № 310 [Instruction on prevention and elimination of salmonellosis of poultry: Order of the Ministry of Agrarian Policy and Food of Ukraine 09/19/2016 № 310]. Available at: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/z1344-16>.
7. Terrestrial Animal Health Code. (2015). In Office International des Epizooties (OIE) editors. Prevention, detection and control of Salmonella in poultry (pp. 1e5). Paris: Office International des Epizooties.France.
8. Hyeon, J.Y., Mann, D.A., Wang, J. (2019). Rapid detection of Salmonella in poultry environmental samples using real-time PCR coupled with immunomagnetic separation and whole genome amplification', Poultry Science. Poultry Science Association Inc. Vol. 98(12), pp. 6973–6979. Available at: <https://doi.org/10.3382/ps/pez425>.
9. Boer, M.D., de Boer, R.F., Lameijer, A. (2019). Selenite enrichment broth to improve the sensitivity in molecular diagnostics of Salmonella. Journal of Microbiological Methods. Elsevier. Vol. 157(November 2018), pp. 59–64. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.12.018>.
10. Pugliese, N., Circella, E., Marino, M. (2019). Circulation dynamics of Salmonella enterica subsp. enterica ser. Gallinarum biovar Gallinarum in a poultry farm infested by Dermanyssus gallinae. Medical and Veterinary Entomology. Vol. 33(1), pp. 162–170. Available at: <https://doi.org/10.1111/mve.12333>.
11. Meng, X., Meng, X., Wang, J. (2019). Small non-coding RNA STnc640 regulates expression of fimA fimbrial gene and virulence of Salmonella enterica serovar Enteritidis', BMC veterinary research. BMC Veterinary Research. Vol. 15(1), 319 p. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2066-7>.
12. Grimont, P.A., Weill, F.X. (2019). Antigenic formulae of the Salmonella serovars. Paris, France: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. 2007.
13. Foti, M., Aleo, A., Daidone, A. (2009.) Salmonella bongori 48:z35:- In migratory birds, Italy. Emerging Infectious Diseases. Vol. 15, no. 3, pp. 502–503. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid1503.080039>.
14. Ahmed, M.M., Rahman, M.M., Mahbub, K.R. (2010). Characterization of Antibiotic Resistant Salmonella spp Isolated from Chicken Eggs of Dhaka City. Journal of Scientific Research. Vol. 3, no. 1, 191 p. Available at: <https://doi.org/10.3329/jsr.v3i1.6109>.
15. Shivaprasad, H. L. (2000) 'Fowl typhoid and pullorum disease', OIE Revue Scientifique et Technique, 19(2), pp. 405–424. Available at: <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1222>.
16. Karisheva, A.F. (2002). "Special'na epizootologija: pidruchnik" ["Special Epizootology: A Textbook"]. Kiiv, Vishha osvita [Kyiv: Higher education]. 703 p.
17. Galka, I.V., Muzikina, L.M., Mandigra, S.S., Chahun, A.I., Sidorenko, T.V., Kravcova, O.L. (2019). Poshirennya sal'monel'ozu tvarin ta ptici v Ukraini u 2015–2018 rokah [Prevalence of salmonellosis in animals and poultry in Ukraine in 2015–2018]. Veterinarna biotekhnologija [Veterinary biotechnology]. Issue 35, pp. 22–29. Available at: <https://doi.org/10.31073/vet>.
18. Lee, K.M., Runyon, M., Herrman, T.J. (2015). Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. Food Control. Elsevier Ltd. Vol. 47, pp. 264–276. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>.
19. Zhang, Z., Xiao, L., Lou, Y. (2015). Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of Vibrio parahaemolyticus, Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in raw shrimp. Food Control. Elsevier Ltd. Vol. 51, pp. 31–36. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.007>.
20. Delbeke, S., Ceuppens, S., Holvoet, K. (2015). Multiplex real-time PCR and culture methods for detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli and Salmonella Thompson in strawberries, a lettuce mix and basil. International Journal of Food Microbiology. Vol. 193, pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.009>.
21. Jia, Y. (2012). Chapter 3 – Real-Time PCR, Methods in Cell Biology. Elsevier. pp. 55–68. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405914-6.00003-2>.
22. Aldridge, P., gnerer, J., Karlinsey, J.E. (2006). Transcriptional and translational control of the Salmonella fliC gene. Journal of Bacteriology. Vol. 188, no. 12, pp. 4487–4496. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00094-06>.
23. Shanmugasundaram, M., Radhika, M., Murali, H.S. (2009). Detection of Salmonella enterica serovar Typhimurium by selective amplification of fliC, fljB, iroB, invA, rfbJ, STM2755, STM4497 genes by polymerase chain reaction in a monoplex and multiplex format', World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 25, no. 8, pp. 1385–1394. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0025-3>.
24. Pabbaraju, K. Gill, K., Wong, A.A. (2019). Simultaneous Detection and Differentiation between Wild-Type and Vaccine Measles Viruses by a Multiplex Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay. Journal of clinical microbiology. Vol. 57, no. 4, pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01828-18>.
25. Liu, J., Li, L. Min., Han, J. quan. (2019). A TaqMan probe-based real-time PCR to differentiate porcine epidemic diarrhea virus virulent strains from attenuated vaccine strains. Molecular and Cellular Probes. Elsevier. Vol. 45, pp. 37–42. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.04.003>.
26. Rukambile, E., Alders, R. (2019). Infection, colonization and shedding of Campylobacter and Salmonella in animals and their contribution to human disease : A review. No. June 2018. pp. 1–17.
27. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017 EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). 2018. EFSA Journal 2018. 16(12):5500, 262 p. Available at: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>

**Идентификация бактерий рода *Salmonella* и сероваров *Enteritidis*, *Typhimurium* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ)****Рубленко Н.М.**

В статье представлены результаты идентификации бактерий рода *Salmonella* в полимеразной цепной реакции в реальном времени. Сконструированы три пары фланкирующих праймеров и флуоресцентных зондов, которые позволяют одновременно идентифицировать род *Salmonella*, а также серовары *Enteritidis* и *Typhimurium* в полимеразной цепной реакции в реальном времени. Оценку специфичности набора праймеров осуществляли на штаммах бактерий рода *Salmonella* разных сероваров Национального центра штаммов микроорганизмов (НЦШМ) Государственного научно-контрольного института биотехнологии штаммов микроорганизмов (ДНКИБШМ) и на 46 полевых штаммах рода *Salmonella*, изолированных от птиц. Для оценки специфичности праймеров в качестве гетерологичных образцов были использованы штаммы *E. Coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 из коллекции НЦШМ. Выделение ДНК бактерий проводили с использованием набора «ДНК-сорб Б» (Амплисенс), постановку реакции ПЦР в реальном времени выполняли с реагентами «Набора для ПЦР в реальном времени» (Синтол) на приборе Bio-rad CFX.

Для оценки чувствительности праймеров исследовали серию 10-кратных разведений ДНК *S. Typhimurium* и *S. Enteritidis*:  $10^{-1}$ - $10^{-5}$ . Установлено, что аналитическая чувствительность праймеров для детекции рода *Salmonella* составляет: для *S. Typhimurium* – 0,25 нг/образец (*Typhimurium*) и *S. Enteritidis* – 0,27 нг/образец (*Enteritidis*).

В результате проведенных исследований подтверждено специфичность набора праймеров и высокую чувствительность. Установлено отсутствие гибридизации праймеров с образцами ДНК других видов бактерий, в частности, отмечено отсутствие неспецифических продуктов реакции. Также подтверждено специфичность наборов праймеров для детекции ДНК сероваров *Enteritidis* и *Typhimurium*. При необходимости данные наборы праймеров могут быть использованы для постановки мультиплексного варианта ПЦР в реальном времени, что позволит одновременно идентифицировать бактерии

рода *Salmonella* и дифференцировать серовары *Enteritidis* и *Typhimurium*.

**Ключевые слова:** *Salmonella*, бактерии, полимеразная цепная реакция, ДНК, ПЦР в режиме реального времени.

**Identification of *Salmonella* spp and serovars *Typhimurium*, *Enteritidis* by qPCR****Rublenko N.**

This article presents the results of the identification of the *Salmonella* genus as well as serovars *Enteritidis* and *Typhimurium* by a real-time polymerase chain reaction. We constructed three pairs of primers and fluorescent probes to simultaneously identify the *Salmonella* genus, serovars *Enteritidis* and *Typhimurium* in a qPCR. The specificity of the primers was evaluated on *Salmonella* strains of different serovars from the National Center for Strains of Microorganisms (UNCMS) strains of the State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms (SSCIBSM) and 46 *Salmonella* strains isolated from poultry. *E. coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 from UNCMS collection were used to check the specificity of the primers as heterologous samples. Bacterial DNA was extracted using a DNA Sorb B (Amplisens) kit, and real-time PCR was accomplished with the "Real-time PCR kit" (Syntol) on Bio-rad CFX.

A series of 10-fold *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* DNA dilutions were studied to evaluate the sensitivity of the primers:  $10^{-1}$ - $10^{-5}$ . The analytical sensitivity of primers for detection of the genus *Salmonella* is: for *S. Typhimurium* - 0.25 ng/sample (*Typhimurium*) and *S. Enteritidis* - 0.27 ng/sample (*Enteritidis*).

The results of the studies confirmed the specificity of the primer set and the high sensitivity. No hybridization of primers with DNA samples of other bacteria found, in particular, the nonspecific reaction products were absent. The primer sets for the detection of DNA of *Enteritidis* and *Typhimurium* serovars also has high specificity. If necessary, this set of primers can be used to perform a multiplex qPCR, that can simultaneously identify bacteria of the *Salmonella* genus and differentiate *Enteritidis* and *Typhimurium* serovars.

**Keywords:** *Salmonella*, bacteria, polymerase chain reaction, DNA, qPCR.



Copyright: © Рубленко Н.М. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

