




**С.М. Бармак<sup>1,2</sup>** , **А.Б. Бердыгалиев<sup>2</sup>**, **Ю.А. Синявский<sup>2</sup>**,  
**А.А. Серикбай<sup>1,2</sup>** , **И.С. Савицкая<sup>1</sup>** , **Т.Ш. Шарманов<sup>2</sup>**,  
**И.Х. Менденхалл<sup>3</sup>**, **Е.В. Жолдыбаева<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Казахская академия питания, Казахстан, г. Алматы

<sup>3</sup>Медицинская школа Duke-NUS, Малайзия, г. Сингапур

<sup>4</sup>Национальный центр биотехнологии, Казахстан, г. Астана, e-mail: [sabyr95@mail.ru](mailto:sabyr95@mail.ru)

## **РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *SALMONELLA ENTERICA***

Для улучшения клинической и лабораторной диагностики сальмонеллеза наиболее перспективным является практическое применение методов молекулярно-генетической диагностики и прежде всего полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая позволит обнаруживать ДНК на ранних стадиях заболевания. Целью данной работы является разработка ПЦР метода для выявления ДНК бактерии *Salmonella enterica*, определение чувствительности и специфичности разработанного метода. Диагностический метод на основе классической ПЦР позволит с высокой точностью в короткие сроки выявлять возбудитель сальмонеллеза и может быть использован для контроля и мониторинга распространения данной инфекции на территории Республики Казахстан.

Одним из основных компонентов ПЦР являются олигонуклеотидные праймеры. При разработке метода ПЦР для выявления ДНК бактерии *Salmonella enterica* нами конструированы праймеры – S Inv -1F и S Inv -1R. Разработанный ПЦР метод отличается высокой специфичностью и чувствительностью (10 микробных клеток/мл) и позволяет выявлять ДНК бактерии *Salmonella enterica* в пробе за 3–4 часа. Результаты представленных исследований указывают на возможность использования полимеразной цепной реакции для обнаружения ДНК бактерии *Salmonella enterica* в образцах из чистой культуры, а также в биологическом материале. Информативность ПЦР была показана при анализе пищевых продуктов, что в реальных условиях позволяет выявить возбудителя бактерий *Salmonella enterica* на ранних стадиях заражения. Создание отечественной ПЦР тест-системы, адаптированной к *Salmonella enterica*, циркулирующей на территории Казахстана, может использоваться в разработке мероприятий по улучшению эпидемиологической и эпизоотической обстановки по сальмонеллезной инфекции.

**Ключевые слова:** *Salmonella enterica*, ДНК, ПЦР, специфичность, чувствительность.

S.M. Barmak<sup>1,2</sup>, A.B. Berdygaliyev<sup>2</sup>, Yu.A. Sinyavskiy<sup>2</sup>, A.A. Serikbay<sup>1,2</sup>,  
I.S. Savitskaya<sup>1</sup>, T.Sh. Sharmanov<sup>2</sup>, I.H. Mendenhall<sup>3</sup>, E.V. Zholdybayeva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>"Kazakh academy of nutrition" LLP, Kazakhstan, Almaty

<sup>3</sup>Duke-NUS Medical school, Malaysia, Singapore

<sup>4</sup>National center for biotechnology, Kazakhstan, Nur-Sultan, e-mail: [sabyr95@mail.ru](mailto:sabyr95@mail.ru)

### **Development of PCR method for *Salmonella enterica* DNA identification**

To improve the clinical and laboratory diagnosis of salmonellosis, the most promising is the practical application of molecular genetic diagnostic methods and, first of all, polymerase chain reaction (PCR), which will allow DNA to be detected in the early stages of the disease. The aim of this work is to develop a PCR method for detecting the DNA of *Salmonella enterica* bacteria, determining the sensitivity and specificity of the developed method. The creation of a diagnostic method based on classical PCR will make it possible to quickly identify the causative agent of salmonellosis with high accuracy and can be used to control and monitor the spread of this infection in the Republic of Kazakhstan.

One of the main components of PCR are oligonucleotide primers. When developing a PCR method for detecting the DNA of the *Salmonella enterica* bacterium, we designed primers S Inv -1F and S Inv -1R. The developed PCR method is highly specific and sensitive (10 microbial cells / ml) and allows the DNA of *Salmonella enterica* bacteria to be detected in a sample in 3–4 hours. The results of the

presented studies indicate the possibility of using the polymerase chain reaction to detect the DNA of the bacterium *Salmonella enterica* in samples from a pure culture, as well as in biological material. The informativeness of PCR was shown in the analysis of food products, which in real conditions can make it possible to detect the causative agent of the bacterium *Salmonella enterica* in the early stages of infection. The creation of a domestic PCR test system adapted to *Salmonella enterica* circulating in Kazakhstan can be used in the development of measures to improve the epidemiological and epizootic conditions for salmonella infection.

**Key words:** *Salmonella enterica*, DNA, PCR, specificity, sensitivity.

С.М. Бармак<sup>1,2</sup>, А.Б. Бердығалиев<sup>2</sup>, Ю.А. Синявский<sup>2</sup>, А.А. Серикбай<sup>1,2</sup>,  
И.С. Савицкая<sup>1</sup>, Т.Ш. Шарманов<sup>2</sup>, И.Х. Менденхалл<sup>3</sup>, Е.В. Жолдыбаева<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>Қазақ тағамтану академиясы, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>3</sup>Медициналық мектеп Duke-NUS, Малайзия, Сингапур қ.

<sup>4</sup>Ұлттық биотехнология орталығы, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ., e-mail: sabyr95@mail.ru

### ***Salmonella enterica* ДНҚ-сын анықтауға арналған ПТР әдісін дамыту**

Сальмонеллездің клиникалық және зертханалық диагнозын жақсарту үшін молекулярлық-генетикалық диагностика әдістерін практикалық қолдану ең перспективалы болып табылады, әсіресе полимеразды тізбекті реакция (ПТР), ол ДНҚ-ны аурудың ерте сатысында анықтауға көмектеседі. Бұл жұмыстың мақсаты – *Salmonella enterica* бактерияларының ДНҚ-сын анықтау үшін ПТР әдісін жасау, әзірленген әдістің сезімталдығы мен ерекшелігін анықтау. Классикалық ПТР негізінде диагностикалық әдісті құру сальмонеллез қоздырғышын жоғары дәлелдігімен тез анықтауға мүмкіндік береді және оны Қазақстан Республикасында осы инфекцияның таралуын бақылау үшін қолдануға болады.

ПТР негізгі компоненттерінің бірі, ол олигонуклеотидті праймерлер болып табылады. *Salmonella enterica* бактериясының ДНҚ-сын анықтаудың ПТР әдісін жасау кезінде S Inv -1F и S Inv -1R праймерлері жасалынды. Әзірленген ПТР әдісі өте ерекше және сезімтал (10 микробтық жасуша / мл). Ол *Salmonella enterica* бактерияларының ДНҚ-сын 3-4 сағат ішінде анықтауға мүмкіндік береді. Ұсынылған зерттеулердің нәтижелері полимеразды тізбекті реакцияны *Salmonella enterica* бактериясының ДНҚ-сын таза культуралар үлгілерінде, сондай-ақ биологиялық материалда анықтау үшін қолдану мүмкіндігін береді. ПТР-нің ақпараттылығы тағам өнімдерін талдауда көрсетілген, бұл нақты жағдайда, инфекцияның ерте сатысында *Salmonella enterica* бактериясының қоздырғышын анықтауға мүмкіндік береді. ПТР отандық тестілеу жүйесін Қазақстанда таралған сальмонеллездің эпидемиологиялық және эпизоотиялық жағдайларын жақсарту бойынша, шараларды жасау кезінде қолдануға болады.

**Түйін сөздер:** *Salmonella enterica*, ДНҚ, ПТР, ерекшелігі, сезімталдық.

## **Введение**

Быстрая идентификация бактериальных штаммов необходима для эффективной диагностики инфекционных заболеваний и в настоящее время имеет особую актуальность. Это связано с циркуляцией возбудителей во внешней среде и периодическими эндемическими вспышками заболеваний [1, 2, 3, 4].

В результате изменения социальных условий общества (широкий обмен продуктов питания, миграция населения и т.д.) число заболеваний сальмонеллезной этиологией возросло во всех странах мира. В то же время увеличилось количество сероваров сальмонелл. Возбудитель сальмонеллеза существует в природе из-за постоянно происходящего эпизоотологического процесса у различных животных и птиц. [5, 6].

При определенных социально-экономических условиях, способствующих реализации определенного механизма передачи возбудителей, сальмонелла также может поражать людей; они могут длительное время циркулировать среди людей, особенно в детских больницах, в случае нарушения санитарно-гигиенического и дезинфекционного режима [7, 8].

Информация о распространенности сальмонелл среди различных видов животных чрезвычайно многочисленна. Практически нет ни одного вида животных, от которого при тщательном исследовании не выделили бы сальмонеллы. Однако не все из них являются эквивалентными источниками инфекции для человека. Наибольшее значение в распространении сальмонеллеза принадлежит сельскохозяйственным животным и птице [9, 10].

Непрерывность технологического процесса получения птицеводческой продукции, концентрация большого числа особей приводит к резкому возрастанию так называемого микробного давления, что является следствием создания благоприятных условий для возникновения болезней, в том числе и сальмонеллеза [11, 12].

Бактерии рода *Salmonella spp.* широко распространены в окружающей среде и, соответственно, в пищевом сырье. Заражение этими патогенами наиболее употребляемых продуктов питания зачастую является основным источником заражения детей [13,14]. Знание эпидемиологической ситуации патогенов в цепи производства пищевых продуктов и правильные профилактические мероприятия по контролю патогенов позволяют уменьшить риск и количество заболеваний детей. Научные эпидемиологические исследования, проведенные в Соединённом Королевстве Великобритании и Северной Ирландии, Финляндии и других странах, в том числе в Российской Федерации, подтверждают факт, что патогенные микроорганизмы широко распространены в цепи производства пищевых продуктов [15, 16]. Основная проблема состоит в том, что контроль качества продуктов крупных производителей осуществляется более регулярно и детально, что нельзя сказать о контроле качества продуктов мелких производителей [17, 18].

Человек заражается сальмонеллой при употреблении в пищу продуктов, которые обсеменены сальмонеллами в процессе их получения, обработки, транспортировки и продажи, которые подверглись недостаточному приготовлению или хранились с нарушением установленных режимов [19,20]. Отсюда следует, что определяющими факторами передачи возбудителей инфекции при сальмонеллезах являются пищевые продукты.

Целью данной работы является разработка ПЦР метода для выявления ДНК бактерии *Salmonella enterica* и определение чувствительности и специфичности разработанного метода.

## Материалы и методы

**Объекты исследования.** В качестве объекта исследований в нашей работе использовали бактериальные штаммы: *Salmonella enterica* Virchow; *Salmonella enterica* Enteritidis; *Salmonella enterica* Typhimurium. Идентификацию микроорганизмов проводили по общепринятой методике по МУ 4.2.2723–10 «Лабораторная диагно-

стика сальмонеллезом, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды». Для определения специфичности ПЦР метода нами были использованы ДНК бактериальных штаммов *Mycoplasma pneumoniae*; *Mycoplasma mycoides* var. *Capri*, *Clostridium perfringens*, *Pasteurella multocida* из коллекции микроорганизмов РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» и биологические образцы продуктов питания – рыба, куриные яйца, творог, куриный фарш, йогурт, мясо утки, куриное мясо.

**Выделение ДНК.** ДНК выделяли из чистой культуры бактерии *Salmonella enterica* и биологических образцов продуктов питания, методом основанным на сорбции ДНК на тонкодисперсной двуокиси кремния.

К 450 мкл лизирующего раствора (1.25 мМ – гуанидина тиоцианата, 50 мМ – ЭДТА, 24.5 мМ – TrisHCl, 0,0013 н – HCl) добавили по 100 мкл гомогенизированного исследуемого образца. Перемешали на вортексе в течение 15 сек, и инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Добавили 450 мкл изопропанола и тщательно перемешали. Далее добавили 10 мкл 6% суспензии двуокиси кремния, еще раз перемешали на вортексе 15 сек и инкубировать при комнатной температуре 10 мин. Центрифугировали пробирки для осаждения сорбента двуокиси кремния при 15 тыс. об/мин в течение 1 мин. Далее удалили надосадочную жидкость. Добавили в каждую пробирку по 500 мкл промывочного раствора (25 % – изопропанола, 103 мМ – NaCl, 10.4 мМ – TrisHCl, 0,000017 н – HCl) и на вортексе в течение 15 сек. Далее центрифугировали при максимальной скорости 30 сек, и удалили надосадочную жидкость. Повторили отмывку промывочным раствором. Добавили 500 мкл 75 % этанола. Перемешали на вортексе в течение 15 сек, затем центрифугировали при максимальной скорости в течение 30 сек. Удалили надосадочную жидкость, далее пробирки поместили в термостат при температуре 65 °С на 10-15 мин для подсушивания сорбента двуокиси кремния. При этом крышки пробирок должны быть открыты. В пробирки добавили по 50 мкл элюента, перемешали и инкубировали при 65 °С в течение 10 мин. Центрифугировали пробы при максимальной скорости 2 мин. Надосадочную жидкость, содержащую ДНК использовали для постановки ПЦР.

**Конструирование праймеров.**

Для подбора специфичных праймеров для выявления бактерии *Salmonella enterica* нами

был выбран ген *Inv* генома бактерии *Salmonella enterica*. Поиск, анализ и отбор нуклеотидных последовательностей гена *Inv* бактерии *Salmonella enterica* проводили в международной базе данных GenBank (CP051269, CP050716, AP020330, CP048775, CP050783). Анализ нуклеотидных последовательностей гена *Inv* осуществляли с помощью компьютерной программы Vector NTI Suite 10. При выборе праймеров S *Inv* -1F (прямой) и S *Inv* -1R (обратный) использовали следующие требования: длина праймеров 17-28 нуклеотидов; процентное содержание G+C пар – 40-60; избегать залипания праймеров самого на себя; образования димеров; температура плавления в пределах 52-59 °C [19,20,21].

Разработанные праймеры специфичны к бактериям *Salmonella enterica* (CP051269, CP050716, AP020330, CP048775, CP050783) и отсутствие перекрестной реакции с бактериями других видов, таких как *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma mycoides var. Capri*, *Clostridium perfringens*, *Pasteurella multocida* осуществляли с помощью программного обеспечения «BLASTn» ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), NCBI) и ПЦР.

**ПЦР-амплификация.** Получение ПЦР-фрагментов гена *Inv* бактерии *Salmonella* проводили с использованием праймеров: S *Inv* -1F (прямой) и S *Inv* -1R (обратный). Амплификацию специфических участков ДНК проводили в термоциклере Эппендорф.

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (1 мкг/мл), при напряженности поля 6 В/см<sup>2</sup>.

Результаты электрофореза учитывали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе «Трансиллюминатор». Результаты реакции выявляются в виде светящихся полос. Положительными (ДНК *Salmonella enterica*) считаются пробы, в которых полосы в геле располагаются точно на таком же расстоянии от старта, что и полосы положительных контролей. При выявлении *Salmonella enterica* наблюдали полосу ДНК размером 500 п.о. В отрицательном контроле не должно выявляться никакие полосы. Деионизированную воду использовали в качестве отрицательного контроля.

### Результаты и обсуждения

#### Конструирование праймеров для выявления ДНК бактерии *Salmonella enterica*

Гены, расположенные в области *Inv* имеются у штаммов всех подвидов *Salmonella enterica*. Анализ филогенетических деревьев, построенных на основе последовательностей гена *Inv*, показывает, что эта область хромосомы сальмонелл была приобретена сальмонеллами в результате горизонтального переноса еще до дифференциации на серовары внутри *Salmonella enterica*, а не в результате последующего переноса между штаммами различных сероваров, поэтому характерные мутации локализованных в гене можно считать генетическими маркерами сероваров [22, 23].

Характеристики синтезированных праймеров представлены в таблице 1.

**Таблица 1** – Характеристики синтезированных праймеров для выявления бактерии *Salmonella enterica*

Праймеры	Последовательность праймеров	Длина	T <sub>плав</sub>	Позиция в геноме	содержание GC-пар	Размер продукта
S <i>Inv</i> -1F (прямой)	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGG	22	58,1	269 – 291	50 %	500 п.о.
S <i>Inv</i> -1R (обратный)	ATCGCCATTTACGCGGGTCA	20	59,8	748 – 768	55 %	

Согласно таблице 1, расчетный размер ПЦР-продукта, получаемый при помощи созданной пары праймеров для выявления бактерии *Salmonella enterica*, составляет 500 п.о.

Зондирование гомологии для выбранных праймеров проводили поисковой системой BLASTn на веб-сайте ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), NCBI). Результаты анализа праймеров представлены в таблице 2.

Компьютерная программа BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/blast>), подтвердила специфичность праймеров S *Inv* -1F и S *Inv* -1R. Показано, что праймеры обозначенные нами S *Inv* -1F (прямой) и S *Inv* -1R (обратный) специфичны к участку гена *Inv* бактерии *Salmonella enterica* на 100 %. Эти данные являются важным условием для использования специфичных праймеров в дальнейшей работе.

Таблица 2 – Анализ праймеров *Salmonella enterica* с использованием программы BLASTn

Штаммы <i>Salmonella enterica</i>	Идентификационный номер в Генбанке	Идентичность, %
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Goldcoast strain R18.0877 chromosome, complete genome	CP037960.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar 4.f5l.12: i – L-3841 DNA. complete genome	AP019375.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar 4.f5l.12: i – L-3833 DNA. complete genome	AP019374.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Kentucky strain K13SKQ02 chromosome	CP037917.1	100
<i>Salmonella enterica</i> strain FSW0104 chromosome, complete genome	CP037894.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain CFSANQ87304 chromosome, complete genome	CP037892.1	100
<i>Salmonella enterica</i> strain FDA00009424 chromosome, complete genome	CP037891.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Montevideo str. 42N chromosome, complete genome	CP037893.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Montevideo str. USDA-ARS-USMARC-1913 chromosome, complete genome	CP025278.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain USDA-ARS-USMARC-60984 chromosome, complete genome	CP025276.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Newport str. USDA-ARS-USMARC-1923 chromosome, complete genome	CP025273.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain USDA-ARS-USMARC-60983 chromosome, complete genome	CP025280.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-0153 InvA (invA) gene, complete cds	MK017941.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-9020 InvA (invA) gene, complete cds	MK017940.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-7977 InvA (invA) gene, complete cds	MK017939.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-9562 InvA (invA) gene, complete cds	MK017937.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-5370 InvA (invA) gene, complete cds	MK017936.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-1295 InvA (invA) gene, complete cds	MK017935.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R9-Q007 InvA (invA) gene, complete cds	MK017934.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-7983 InvA (invA) gene, complete cds	MK017933.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-5224 InvA (invA) gene, complete cds	MK017932.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Stanley strain so wt8 chromosome, complete genome	CP036167.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium strain so wt7 chromosome, complete genome	CP036168.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Brancaster strain so ww281 chromosome, complete genome	CP036166.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Albany strain so wt5 chromosome, complete genome	CP036165.1	100

Экспериментальные работы по определению состава реакционной ПЦР смеси, а также по подбору оптимальных температурно-временных параметров амплификации позволили отработать условия постановки ПЦР.

Для амплификации ДНК бактерии *Salmonella enterica* использовали реакционную смесь объемом 25 мкл, состоящая из:

х10 ПЦР буфер	- 2,5 мкл
dNTP mix 10 мМ	- 1 мкл
MgCl <sub>2</sub>	- 2 мкл
Праймер S Inv -1F (20 пмоль)	- 1 мкл
Праймер S Inv -1R (20 пмоль)	- 1 мкл
ДНК <i>Salmonella enterica</i>	- 3 мкл
Тақ ДНК полимеразы (5 Ед)	- 0,5 мкл
Деионизированная вода	до 25 мкл

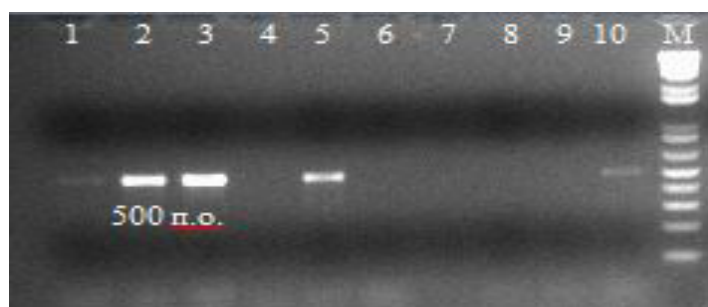
В процессе проведения экспериментов по подбору оптимальных температур и параметров времени для проведения ПЦР при *Salmonella enterica* нами был выбран следующий режим:

пре-денатурация, 94 °С – 5 мин  
денатурация, 94 °С – 30 сек  
отжиг 57 °С – 30 сек 35 циклов  
репликация, 72 °С – 1 мин  
пост-репликация, 72 °С – 7 мин

При положительном результате реакции после разделения ПЦР продукта в агарозном геле в присутствии бромистого этидия проявляется полоса размером 500 п.о. Отсутствие или наличие полосы ДНК другого размера говорит об отрицательном результате.

При разработке амплификационного ПЦР метода для оценки аналитической специфичности и чувствительности праймеров осуществлена серия экспериментов с использованием ДНК бактерии *Salmonella enterica*.

*Определение специфичности ПЦР метода.* Проведен опыт по определению специфичности ПЦР метода. Использованы материалы *Salmonella enterica* Virchow, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma mycoides* var. Capri, *Clostridium perfringens*, *Pasteurella multocida*. При постановке ПЦР в качестве положительного контроля использована ДНК *Salmonella enterica* Enteritidis. В качестве отрицательного контроля использована деионизированная вода. Полученные результаты представлены на рисунке 1.



1 – *Salmonella enterica* Virchow; 2 – *Salmonella enterica* Enteritidis;  
3 – *Salmonella enterica* Typhimurium; 4 – *Mycoplasma pneumoniae*;  
5 – *Salmonella enterica* Enteritidis; 6 – *Mycoplasma mycoides* var. capri;  
7 – *Clostridium perfringens*; 8 – *Pasteurella multocida*;  
9 – Отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O); 10 – Положительный контроль –  
*Salmonella enterica* Enteritidis; М – маркер ДНК, 1 kb «Invitrogen».

**Рисунок 1** – Электрофореграмма продуктов амплификации при определении специфичности ПЦР метода для выявления *Salmonella enterica*

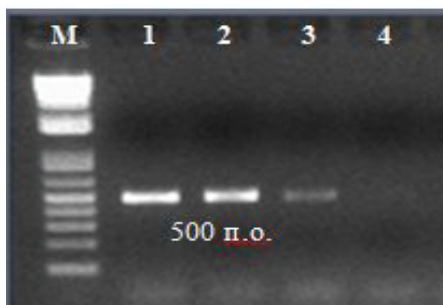
При определении специфичности метода ПЦР для выявления *Salmonella enterica* было установлено, что во всех пробах, содержащих ПЦР продукты *Salmonella enterica* (пробы №1, №2, №3, №5, положительный контроль – №10) наработаны специфические ПЦР продукты размером 500 п.о. Отрицательные результаты были

получены при использовании в качестве матриц ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma mycoides* var. Capri, *Clostridium perfringens*, *Pasteurella multocida*.

*Определение чувствительности ПЦР метода.* При определении чувствительности ПЦР метода использованы отработанные оп-

тимальные температурно-временные условия реакции. Для определения чувствительности использована бактериальная суспензия

*Salmonella enterica* от 1000 до 1 микробных клеток/мл. Полученные результаты представлены на рисунке 2.



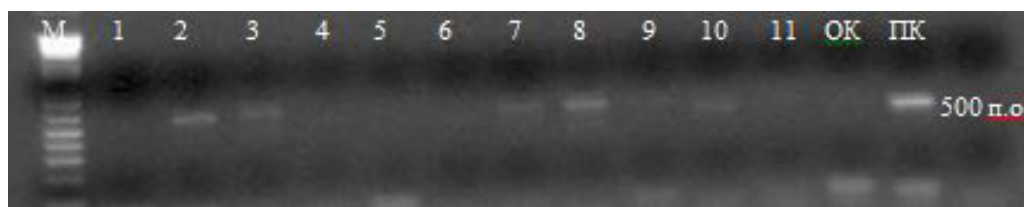
М – маркер ДНК «1 kb DNA Ladder, Invitrogen»;  
Использованы ДНК, выделенные из бактериальных суспензий *Salmonella enterica*:  
1 – 1000 микробных клеток/мл; 2 – 100 микробных клеток/мл;  
3 – 10 микробных клеток/мл; 4 – 1 микробных клеток/мл.

**Рисунок 2** – Определение чувствительности тест-системы для выявления *Salmonella enterica* методом ПЦР

В результате проведенных экспериментов минимальный порог чувствительности реакции амплификации, при котором происходила детекция ДНК всех штаммов бактерии *Salmonella enterica* с помощью праймеров S Inv -1F и S Inv -1R, составил 10 микробных клеток/мл.

Для оценки возможности применения праймеров в целях выявления бактерии *Salmonella enterica* использованы ДНК, выделенные из биологических образцов продуктов питания.

Результаты представлены на рисунке 3.



1 – рыба; 2 – куриные яйца 1; 3 – куриные яйца 2; 4 – творог; 5 – куриный фарш; 6 – йогурт;  
7 – куриные яйца 3; 8 – куриные яйца 4; 9 – мясо утки; 10 – куриное мясо; 11 – рыба продукт;  
ОК – отрицательный контроль; ПК – положительный контроль.

**Рисунок 3** – Выявление ДНК бактерии *Salmonella enterica* в продуктах питания методом ПЦР

В результате работы установлено, что праймеры S Inv -1F и S Inv -1R способны детектировать ДНК *Salmonella enterica* в зараженных сальмонеллезом куриных яйцах (пробы №2, №3, №7 и №8), в мясе утки (№9) и в курином мясе (№10).

Таким образом, в результате проделанной работы бактерии *Salmonella enterica* идентифицированы в шести биологических образцах продуктов питания.

В последнее время по данным литературы [24] с наибольшей частотой сальмонеллы обна-

руживаются в мясе птицы (тушках и желудках цыплят-бройлеров; курином фарше, печени, голени и крылышках; голени и сердце индейки) – 31,43%, рыбе (сазан, лещ, судак и сельдь) – 13,16% и яйцах – 10% (рисунок 4).

По уровню контаминации сальмонеллами продукты питания можно расположить в следующем порядке: птица – рыба – яйца – мясо – колбасы – молочные продукты – овощи. Заражение сальмонеллезом может произойти при употреблении контаминированного молока, тер-

мически необработанных куриных яиц, инфицированных до снесения, а также продуктов, приготовленных из них. Другой фактор передачи – недостаточно обработанное мясо птицы, говядины, свинины. Поэтому необходимо строго соблюдать санитарно-гигиенические правила про-

дажи, приготовления и потребления пищевых продуктов. Опасность таится не только в самом присутствии сальмонелл в продуктах питания, но и в наличии в пище продуктов их жизнедеятельности, которые и являются причиной токсикоинфекции.

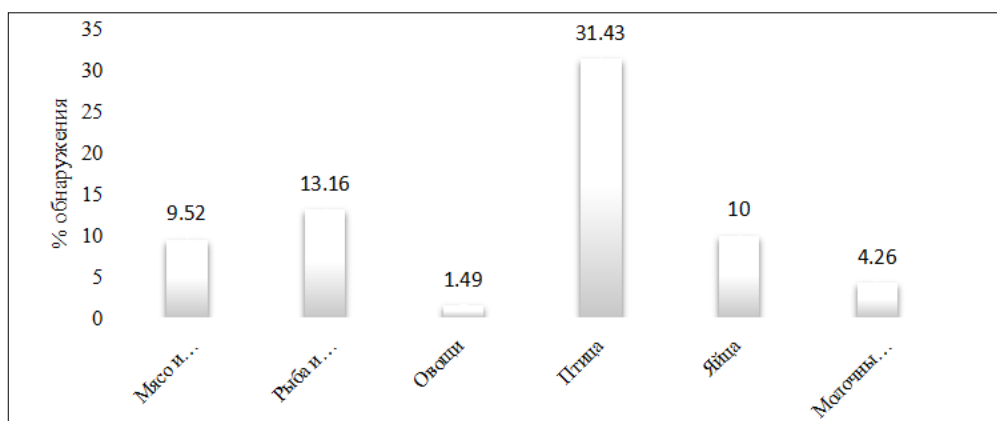


Рисунок 4 – Частота обнаружения сальмонелл в продуктах питания (%)

Эффективные стратегии профилактики на протяжении всей пищевой цепи от фермы до потребителя являются наиболее действенными средствами производства безопасных пищевых продуктов. FAO и ВОЗ призывают страны к созданию программ контроля на протяжении всей пищевой цепи и к использованию таких систем, которые позволяют осуществлять меры контроля в точке наибольшей эффективности, в том числе в секторе первичного производства [25,26,27].

Необходимо отметить, что успех борьбы с бактериальными заболеваниями в большой степени зависит от своевременного обнаружения и идентификации возбудителей. В настоящее время существует достаточно много методических подходов, позволяющих решить эту проблему. Это и классические методы бактериологии, и иммунохимические методы, и молекулярно-биологические методы тестирования, получающие все более широкое распространение благодаря быстрому развитию биотехнологической науки.

Для диагностики и идентификации сальмонеллеза к настоящему времени в мире разработаны и применяются различные серологические и иммунологические методы [28, 29, 30]. Все эти методы имеют различную диагностическую ценность – одни из них требуют значительных затрат времени, другие имеют низкую чувствительность и специфичность. Поэтому усо-

вершенствование и разработка более чувствительных и специфичных, а также экспрессных методов лабораторной диагностики остается актуальной проблемой и до настоящего времени.

### Заключение

Разработаны праймеры для обнаружения ДНК *Salmonella enterica* на основе гена *Inv* и выявлена их эффективность при идентификации культур и обнаружении ДНК *Salmonella enterica* в пробах из чистой культуры, а также в биологическом материале.

Разработанный метод ПЦР для выявления *Salmonella enterica* может быть использован для установления диагноза при исследовании продуктов питания.

Разработанный метод ПЦР для выявления бактерии *Salmonella enterica* обладает высокой специфичностью и чувствительностью (10 микробных клеток/мл) и может использоваться для выявления возбудителя сальмонеллеза.

Работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования «Генотипирование патогенных микроорганизмов в пищевом сырье и продуктах питания, реализуемых на рынках и супермаркетах Республики Казахстан, разработка рекомендаций для снижения риска заболеваемости детей дошкольного и школьного возраста», 2018–2020 гг., № AP05131147.



### Литература

- 1 Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Новикова О.Б., Борисенкова А.Н., Белаш Д.Э., Яковлев А.Ф. Эффективный молекулярно-генетический метод идентификации штаммов сальмонелл и протей // Доклады российской академии сельскохозяйственных наук. – 2013. – №5. – С. 60-63
- 2 Жебрун А.Б., Мукомолов С.А., Нарвская О.В. Генотипирование и субтипирование патогенных микроорганизмов в развитии технологий эпидемиологического надзора // Медицинский академический журнал. – 2009. – №4. – С. 59-67.
- 3 Terletskiy, V., Tyshchenko, V., Martinez-Ballesteros, I., Garaizar, J., & Bikandi, J. Validation of double digest selective label database for sequenced prokaryotic genomes. *Bioinformatics*. – (2009). – 26(3). – 417–418.
- 4 Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Новикова И.И., Бойкова И.В., Тюлебаев С.Д., Шахтамиров И.Я. Эффективный метод генетической паспортизации штаммов *Bacillus subtilis* – перспективных продуцентов биопрепаратов // Микробиология – 2016. – Т. 85 №1.- С. 50-55.
- 5 Korenberg, E. I. Natural focaloty of infections: Current problems and prospects of research. *Biology Bulletin*. – 2010. – 37(7). – 665–676.
- 6 Maunsell, F., & Donovan, G. A. Biosecurity and Risk Management for Dairy Replacements. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* -2008 – 24(1). 155–190.
- 7 Костенко Ю.Г., Храмов М.В., Давлеев А.Д. Проблема пищевого сальмонеллеза в России: объективный взгляд и пути решения // Все о мясе. – 2012. – №1. – С. 34-37
- 8 Парфенчик И.В., Цыркунов В.М., Васильев А.В., Богданович Т.И. Лечение и санация больных сальмонеллезом, вызванным штаммами *S. infantis* и *S. Mission* // Рецепт. – 2010. – №5. – С. 82-91
- 9 Мезенцев С.В., Разумовская В.В., Распространение сальмонелл в продукции животноводства // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2014 №7, С. 118-125
- 10 N. Starodub, J. Ogorodnijchuk Efficiency of immune biosensor based on total internal reflection ellipsometry at the determination of *Salmonella* // 14th International Meeting on Chemical Sensors – IMCS 2012 P. 884 – 887
- 11 Салаутин В.В. Пагоморфология и дифференциальная диагностика сальмонеллеза птиц, вызванного различными серовариантами возбудителя: авт. дис. ... докт. вет. наук. – Саратов, 2004. – 28 с.
- 12 Чугунова Е.О., Татарникова Н.А., Прохорова Т.С., Мауль О.Г. Зараженность сальмонеллами продукции птицеводства // Современные проблемы науки и образования, – 2014, №6 С. 18-23
- 13 Scharff R. L. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *Journal of Food Protection* 2012, 75:123-131.
- 14 Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*, 45(2), 545–556.
- 15 Alali W. Q., Gaydashov R., Petrova E., Panin A., Tugarinov O., Kulikovskii A., Mamleeva D., Walls I., Doyle M. P. Prevalence of *Salmonella* on retail chicken meat in Russian Federation. *Journal of Food Protection* 2012, 75:1469-73.
- 16 Lay K. S., Vuthy Y., SongP., Phol K., Sarthou J.L. Prevalence, numbers and antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. in retail poultry in Phnom Penh, Cambodia. *Journal of Veterinary Medical Science* 2011, 73:325-329.
- 17 Old D. C., Chisholm S. A., Crichton P. B., Taylor A. Grouping of *Salmonella enterica* serotype Montevideo strains by ribotyping and IS200 profiling. *Epidemiology and Infection* 2000, 124:375-382.
- 18 Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Moraes, P. M., Viçosa, G. N., & Nero, L. A. (2010). Microbiological Quality and Safety of Raw Milk and Soft Cheese and Detection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria with Antagonistic Activity Against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Spp., and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(2), 175–180.
- 19 Е.О. Чугунова, Н.А. Татарникова, Определение бактерий рода *Salmonella* в мясе и мясных полуфабрикатах // Пермский аграрный вестник – 2013, №1 С. 41-44
- 20 Ручнова О.И., Куркина Е.С. Биологические свойства изолятов бактерий рода *Salmonella* // Евразийский союз ученых, – 2014 №30-1 С. 11-14
- 21 Кригер О.В., Солдатова Л.С., Кравченко А.Ю., Новоселова М.В. Основные аспекты конструирования праймеров для определения видовой принадлежности ДНК крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2.
- 22 Norgeo, J. L., Ardura, A., Pola, I. G., Martinez, J. L., & Garcia-Vazquez, E. (2012). Universal primers for species authentication of animal foodstuff in a single polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 354–361.
- 23 Laube, I., Hird, H., Brodmann, P., Ullmann, S., Schöne-Michling, M., Chisholm, J., & Broll, H. (2010). Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. *Food Chemistry*, 118(4), 979–986.
- 24 Стрелков А.А. Разработка ускоренного иммунологического метода индикации сальмонелл в продовольственном сырье и кормах. Автореферат кандидата биологических наук по ВАК РФ 06.02.05, 2011, Москва.
- 25 Яцышина С.Б. Выявление и типирование возбудителей сальмонеллеза молекулярно-генетическими методами. Автореферат кандидата биологических наук по ВАК РФ 16.00.03, 2003, Москва.
- 26 Отчет «Генотипирование патогенных микроорганизмов в пищевом сырье и продуктах питания, реализуемых на рынках и супермаркетах Республики Казахстан, разработка рекомендаций для снижения риска заболеваемости детей дошкольного и школьного возраста.

27 EFSA. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of Salmonella in holdings of laying hen flocks of Gallus gallus. Parma, Italy: EFSA, 21February 2007. Available at: [http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring\\_zoonoses/reports/report\\_finlayinghens.html](http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring_zoonoses/reports/report_finlayinghens.html)

28 Snow, L. C., Davies, R. H., Christiansen, K. H., Carrique-Mas, J. J., Cook, A. J. C., & Evans, S. J. (2010). Investigation of risk factors for Salmonella on commercial egg-laying farms in Great Britain, 2004-2005. *Veterinary Record*, 166(19), 579–586.

29 CARRIQUE-MAS, J. J., BRESLIN, M., SNOW, L., McLAREN, I., SAYERS, A. R., & DAVIES, R. H. (2008). Persistence and clearance of different Salmonella serovars in buildings housing laying hens. *Epidemiology and Infection*, 137(06), 837.

30 Gunn, J. S., Marshall, J. M., Baker, S., Dongol, S., Charles, R. C., & Ryan, E. T. Salmonella chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence // *Trends in Microbiology*, – 2014 22(11), 648–655.

## References

1 Terleckij V.P., Tyshchenko V.I., Novikova O.B., Borisenkova A.N., Belash D.E., YAKovlev A.F. (2013) Effektivnyj molekulyarno-geneticheskij metod identifikacii shtammov sal'monell i proteya // *Doklady Rossijskoj akademii sel'skohozyajstvennyh nauk.* – №5. – S. 60-63

2 ZHebrun A.B., Mukomolov S.A., Narvskaya O.V. (2009) Genotipirovanie i subtipirovanie patogennyh mikroorganizmov v razvitii tekhnologij epidemiologicheskogo nadzora // *Medicinskij akademicheskij zhurnal.* – №4. – S. 59-67.

3 Terletskiy, V., Tyshchenko, V., Martinez-Ballesteros, I., Garaizar, J., & Bikandi, J. (2009) Validation of double digest selective label database for sequenced prokaryotic genomes. *Bioinformatics.* – 26(3). – 417–418.

4 Terleckij V.P., Tyshchenko V.I., Novikova I.I., Bojkova I.V., Tyulebaev S.D., SHAhtamirov I.YA. (2016) Effektivnyj metod geneticheskoy pasportizacii shtammov Bacillus subtilis – perspektivnyh producentov biopreparatov // *Mikrobiologiya* – T. 85 №1.- S. 50-55.

5 Korenberg, E. I. (2010) Natural focality of infections: Current problems and prospects of research. *Biology Bulletin.* – 37(7). – 665–676.

6 Maunsell, F., & Donovan, G. A. (2008) Biosecurity and Risk Management for Dairy Replacements. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* – 24(1). 155–190.

7 Kostenko YU.G., Hramov M.V., Davleev A.D. (2012) Problema pishchevogo sal'monelleza v Rossii: ob'ektivnyj vzglyad i puti resheniya // *Vse o myase.* – №1. – S. 34-37

8 Parfenchik I.V., Cyrkunov V.M., Vasil'ev A.V., Bogdanovich T.I. (2010) Lechenie i sanaciya bol'nyh sal'monellezom, vyzvannym shtammami S. infantis i S. Mission // *Recept.* – №5. – S. 82-91

9 Mezencev S.V., Razumovskaya V.V. (2014) Rasprostranenie sal'monell v produkcii zhivotnovodstva // *Vestnik Altajskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta.* №7, S. 118-125

10 N. Starodub, J. (2012) Ogorodnijchuk Efficiency of immune biosensor based on total internal reflection ellipsometry at the determination of Salmonella // 14th International Meeting on Chemical Sensors – IMCS P. 884 – 887

11 Salautin V.V. (2004) Patomorfologiya i differencial'naya diagnostika sal'monelleza ptic, vyzvannogo razlichnymi serovariantami vzbudatelya: avt. dis. ... dokt. vet. nauk. – Saratov, – 28 s.

12 CHugunova E.O., Tatarnikova N.A., Prohorova T.S., Maul' O.G. (2014) Zarazhennost' sal'monellami produkcii pticevodstva // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, №6 S. 18-23

13 Scharff R. L. (2012) Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *Journal of Food Protection* 75:123-131.

14 Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & Garcia-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review. *Food Research International*, 45(2), 545–556.

15 Alali W. Q., Gaydashov R., Petrova E., Panin A., Tugarinov O., Kulikovskii A., Mamleeva D., Walls I., Doyle M. P. (2012) Prevalence of Salmonella on retail chicken meat in Russian Federation. *Journal of Food Protection* 75:1469-73.

16 Lay K. S., Vuthy Y., SongP., Phol K., Sarthou J.L. (2011) Prevalence, numbers and antimicrobial susceptibilities of Salmonella serovars and Campylobacter spp. in retail poultry in Phnom Penh, Cambodia. *Journal of Veterinary Medical Science* 73:325-329.

17 Old D. C., Chisholm S. A., Crichton P. B., Taylor A. (2000) Grouping of Salmonella enterica serotype Montevideo strains by ribotyping and IS200 profiling. *Epidemiology and Infection* 124:375-382.

18 Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Moraes, P. M., Viçosa, G. N., & Nero, L. A. (2010). Microbiological Quality and Safety of Raw Milk and Soft Cheese and Detection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria with Antagonistic Activity Against Listeria monocytogenes, Salmonella Spp., and Staphylococcus aureus. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(2), 175–180.

19 E.O. CHugunova, N.A. Tatarnikova. (2013) Opredelenie bakterij roda Salmonella v myase i myasnyh polufabrikatah // *Permskij agrarnyj vestnik* №1 S. 41-44

20 Ruchnova O.I, Kurkina E.S. (2014) Biologicheskie svojstva izolyatov bakterij roda Salmonella // *Evrazijskij soyuz uchenykh* №30-1 S. 11-14

21 Kriger O.V., Soldatova L.S., Kravchenko A.YU., Novoselova M.V. (2012) Osnovnye aspekty konstruirovaniya prajmerov dlya opredeleniya vidovoj prinadlezhnosti DNK krupnogo rogatogo skota metodom polimeraznoj cepnoj reakcii // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* – № 2.

22 Horreo, J. L., Ardura, A., Pola, I. G., Martinez, J. L., & Garcia-Vazquez, E. (2012). Universal primers for species authentication of animal foodstuff in a single polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 354–361.

23 Laube, I., Hird, H., Brodmann, P., Ullmann, S., Schöne-Michling, M., Chisholm, J., & Broll, H. (2010). Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. *Food Chemistry*, 118(4), 979–986.

24 Strelkov A.A. (2011) Razrabotka uskorennoho immunologicheskogo metoda indikacii sal'monell v prodovol'stvennom syr'e i kormah. Avtoreferat kandidata biologicheskikh nauk po VAK RF 06.02.05, , Moskva.

25 YAcyshina S.B. (2003) Vyyavlenie i tipirovanie vozbuditelej sal'monelleza molekulyarno-geneticheskimi metodami. Avtoreferat kandidata biologicheskikh nauk po VAK RF 16.00.03, Moskva.

26 Otchet «Genotipirovanie patogennyh mikroorganizmov v pishchevom syr'e i produktah pitaniya, realizuemyh na rynkah i supermarketah Respubliki Kazahstan, razrabotka rekomendacij dlya snizheniya riska zaboлеваemosti detej doshkol'nogo i shkol'nogo vozrasta.

27 EFSA. (2007) Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. Parma, Italy: EFSA, 21February. Available at: [http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring\\_zoonoses/reports/report\\_finlayinghens.html](http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring_zoonoses/reports/report_finlayinghens.html)

28 Snow, L. C., Davies, R. H., Christiansen, K. H., Carrique-Mas, J. J., Cook, A. J. C., & Evans, S. J. (2010). Investigation of risk factors for *Salmonella* on commercial egg-laying farms in Great Britain, 2004-2005. *Veterinary Record*, 166(19), 579–586.

29 CARRIQUE-MAS, J. J., BRESLIN, M., SNOW, L., McLAREN, I., SAYERS, A. R., & DAVIES, R. H. (2008). Persistence and clearance of different *Salmonella* serovars in buildings housing laying hens. *Epidemiology and Infection*, 137(06), 837.

30 Gunn, J. S., Marshall, J. M., Baker, S., Dongol, S., Charles, R. C., & Ryan, E. T. (2014) *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence // *Trends in Microbiology*, 22(11), 648–655.