

УДК 619:579.842.1/.2:577.212.2

## **ИДЕНТИФИКАЦИИ *SALMONELLA ENTERITIDIS* И *SALMONELLA TYPHIMURIUM* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНО ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Семина А.Н.-к.в.н., вед. науч. сотрудник, Абгарян С.Р.-ст. науч. сотрудник.  
«Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» — филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН (ВНИВИП)

**Ключевые слова:** сальмонеллез, птица, праймеры, диагностика, молекулярно-генетические исследования, ПЦР. **Key words:** salmonellosis, poultry, primers, diagnostics, molecular genetic studies, PCR.



### **РЕФЕРАТ**

На территории Российской Федерации продолжают отмечаться вспышки сальмонеллеза. Каждый год обычно фиксируется приблизительно 50000 ситуаций сальмонеллеза людей. Смертность от данной инфекции, может составлять 0,02-0,04 на 100 тыс. жителей. Из имеющихся на территории РФ сероваров сальмонелл, преобладающую роль отводят *S. Enteritidis* - 85% далее следует *S. Typhimurium* - 12% , *S. Infantis* - 10% и другие – 6%. В основном *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Gallinarum-pullorum* чаще всего выделяют от птиц

Задачей настоящего исследования является разработка уникальных образцов олигонуклеотидных последовательностей позволяющих обнаружить ДНК микроорганизмов рода *Salmonella*. Серовары сальмонелл трудно генетически типировать из-за их высокой степени идентичности. Исследования проведенные в изучении условий патогенности сальмонелл показали, что для идентификации штаммов сальмонелл молекулярно-генетическим методом могут быть использованы в качестве мишеней области островков патогенности. Проанализировав публикации нами были выбраны области гена *invA* по генетическому маркеру – гену *spvA* с целью получения уникальные последовательности сиквенсов для серовариантов *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*. Сиквенсы генов *invA* и *sefA* выравняли подбирая схожие у абсолютно всех серовариантов сальмонелл части, локализующиеся в первой половине гена. С помощью программы BLAST на сервере NCBI была оценена специфичность подобранных праймеров. В результате поиска в базе данных последовательностей GenBank выявлена 100% гомология выбранных праймеров лишь с гомологичными последовательностями в геноме *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*. Исследование проб, содержащих патологические агенты бактериальной природы методом ПЦР, подтвердило специфичность выбранных праймеров. Положительные результаты были получены только с пробами, содержащими *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*. Таким образом, подобранные праймеры могут быть предложены для исследования проб разного состава для выявления геномов *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Вид *Salmonella*, имеющий больше 2500 сероваров (серотипов), вступает в семейство Enterobacteriaceae (энтеробактерий). Бактерии палочковидной формы, грамотрицательные, аспорогенные, в большей степени подвижные.

На долю сальмонелл приходится инфицирование многих разновидностей продуктов питания. Связи с этим в большинстве стран мира их принято относить к одним из наиболее опасных возбудителей кишечных инфекций. Для человека и животных из рода *Salmonella* наиболее пато-

генным является вид *S. Enterica*. Поделен данный вид на 6 подвидов. Чаще всего возбудитель пищевых токсикоинфекций является подвид *S. Enterica* subsp. - *Enteritidis*. Возбудители таких инфекций как брюшного тифа у людей, паратифов А и В выступают подвиды *S. Enterica* subsp. - *Typhi*, *S. Enterica* subsp. - *Paratyphi* А, В [1].

Не смотря на применяемые меры по ликвидации и не допущению распространения возбудителя сальмонеллеза отмечается тенденция роста данной инфекции. Постоянное наблюдение осуществляемый ВОЗ за пищевыми инфекциями выявили, что 49% абсолютно всех вспышек были вызваны сальмонеллами, из них 34% являлись следствием употребления в пищу куриного мяса. Чаще всего птица не проявляет признаков болезни и является скрытым носителем данного заболевания. Полученные продукты питания от такой птицы представляют угрозу для жизни людей. [2].

На территории Российской Федерации продолжают отмечаться вспышки сальмонеллеза. Каждый год обычно фиксируется приблизительно 50000 ситуации сальмонеллеза людей. Смертность от данной инфекции, может составлять 0,02-0,04 на 100 тыс. жителей. Из имеющихся на территории РФ сероваров сальмонелл, преобладающую роль отводят *S. Enteritidis* - 85% далее следует *S. Typhimurium* - 12% , *S. Infantis* - 10% и другие –

6%. В основном *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Gallinarum-pullorum* чаще всего выделяют от птиц [4].

Бактерий данного рода обладают рядом особенностей таких как, имеют высокую термостойкость, устойчивы к высушиванию, что приводит в свою очередь к решению вопроса об сохранности многих продуктов питания от патогена. Согласно регламенту во многих странах мира ведется строгий контроль за содержанием сальмонелл в пищевых продуктах. Микробиологические методы которые используются для определения присутствия сальмонеллы в пище и кормах в большинстве случаев могут длиться до 7 дней. Многие продукты питания не имеют длительных сроков хранения и требуют быстрой реализации, а такие сроки проведения исследований приводят к значительной задержке [3]. Применение инновационных методов обнаружения сальмонелл позволят относительно быстро проводить реализацию готовой продукции и тем самым будут снижать затраты на ее хранение. Связи с этим, такие методы как экспресс-диагностики сальмонелл вызывают все больший интерес. Поэтому данные методы диагностики представляемые для этих целей должны обладать рядом показателей в первую очередь обязаны быть чувствительными, специфичными, экономически результативными и удобными. Учитывая данные требования выбор может быть сделан в пользу моле-

Таблица 1

Последовательности праймеров.

Определяемый вид	Название праймера	Последовательность	Размер ампликона, п.о.
<i>S. Enteritidis</i>	SEFA-1	GGCTTCGGTATCTGGTGGTGTG	320
	SEFA-2	GTCATTAATATTGGCTCCCTGAATA	
<i>S. Typhimurium</i>	Inv-1	ATG GTC TTG TEG CCC AGA TC	288
	Inv-2	EGG ATE TEA TTA ATE AAC AAT AC	

кулярно генетических исследований бактериальной ДНК методом ПЦР [5].

Учитывая тот факт, что преимущественно часто встречаемыми сероварами сальмонелл среди птицы в последнее время все чаще являются *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* нами была определена задача разработать методологию подбора уникальных образцов олигонуклеотидных последовательностей праймеров с помощью которых можно проводить идентификацию данных видов.

#### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

С целью оценки аналитической специфичности подобранных образцов олигонуклеотидных последовательностей применялись последующие штаммы, имеющиеся в коллекции ВНИВИП отдела микробиологии: *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium*. Культивирование микроорганизмов проходило на мясопептонном бульоне (МПБ, ГОСТ 29730-75) и мясопептонном агаре (МПА, ТУ 46-12-252-78). Используя оптический стандарт мутности определяли концентрацию микробных клеток.

Для генотипирования серовариантов сальмонелл были получены сиквенсы гена *invA* и *sefA* (код доступа NC\_011294.1, GenBank, NCBI). С помощью ресурса базы данных GeneBank осуществляли подборку олигонуклеотидных последовательностей.

Исследование подобранных нуклеотидных последовательностей на изменчивость и отбор реакционных зон, требуемых с целью подбора праймеров проводили с поддержкой концепции ClustalW Multi Sequence Alignment. Особенность подобранных праймеров на теоретическом уровне исследовали с поддержкой компьютерных программы FASTA (Pearson W.G. 2000) и BLAST on-line ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)). Все примененные в работе олигонуклеотидные праймеры синтезировали ЗАО Евроген (г.Москва).

ДНК выделяли из суспензии клеток при помощи набора реагентов "ДНК-сорб В" (Россия, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии), согласно прилагаемому наставлению.

Аmplификацию проводили на приборе «ТЕРЦИК» ("ДНК-технология") конечный объем исследуемого образца составлял 25 мкл. В пробирку емкостью 0,5 мл вносили следующие компоненты: дионизованная вода до 25 мкл; смесь праймеров – 1мкл (прямого и обратного); 5х окрашенная реакционная смесь ScreenMix; ДНК (исследуемый образец) – 5 мкл. Встряхивали пробирку на смесителе, все капли со стенок собирают центрифугированием в течении 5-10 сек. На поверхность водной фазы наносят 2 капли вазелинового масла. Переносят пробы в амплификатор и проводят ПЦР при следующих режимах: начальная денатурация 95 °С - 5 мин; 35 циклов амплификации: денатурация 95 °С - 20 сек, отжиг праймеров 57 °С -30 сек, элонгация 72 °С - 20 сек, и окончательная элонгация 72 °С – 3 мин; 10 °С - хранение. В процессе исследований проводился подбор подходящей рабочей концентрации праймеров и температуры отжига при которых будет оптимально проходить реакция.

Анализ продуктов реакции проводили в 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий. В качестве маркера использовали известные фрагменты ДНК длиной 100-1500 пар нуклеотидов: 100, 200, 400, 850, 1500. Маркер используется для быстрого и точного определения длины и количества ДНК в 2%-ном агарозном геле. Амплифицированные фрагменты очищали от не прореагировавших праймеров и секвенировали. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводили в ДНК-секвенаторе «MegaBACE 750» в режиме генотипирования. В исследуемых образцах проводили определение размеров выявленных последовательностей и соответствующих генотипов ДНК с использованием специализированной программы «MegaBACE Genetic Profiler v.2.2».

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

В результате исследований были использованы мишени, позволяющие идентифицировать сероварианты: *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* в нашей аналитической системе. В резуль-

тате анализа была выбрана область гена *invA* и *sefA*. Для дизайна видоспецифичных праймеров были использованы нуклеотидные последовательности депонированные в банке данных NCBI. С целью выявления внутривидового полиморфизма в области расположения диагностических праймеров, с помощью программы FASTA и BLAST, были созданы последовательности из групп нуклеотидных последовательностей, относящихся к определенному виду *Salmonella*. Затем был проведен сравнительный биоинформатический анализ полученных последовательностей между собой. При анализе полученных данных были выбраны наиболее консервативные для детектируемого вида участки *invA* и *sefA*. На их основе были подобраны видоспецифичные праймеры для проведения ПЦР (табл.1).

Проведя анализ продуктов реакции было установлено, что наличие в геле фрагмента ДНК длиной 320 п.н. свидетельствует о присутствии ДНК *Salmonella* Enteritidis в исследуемом материале. Соответственно фрагмент длиной 288 п.н. свидетельствует о наличии ДНК *Salmonella* Typhimurium. Начиная с этапа выделения ДНК ставился отрицательный контроль реакции для исключения ошибочного результата. Образование данных фрагментов было строго специфично и не наблюдалось никаких фрагментов при добавлении ДНК *Salmonella* Enteritidis к праймерам подобранных к *Salmonella* Typhimurium и наоборот. С целью подтверждения полученных результатов было проведено сравнение нуклеотидных последовательностей с помощью секвенирования, которое позволило определить уровень отличий. На основании чего проводилась штаммовая дифференциация данных серовариантов.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Предлагаемые олигонуклеотидные последовательности позволяют определять гены *invA* и *sefA* длиной 320 п.н. и 288 п.н. соответственно. Таким образом с помощью подобранных нами олигонуклеотидных последовательностей можно

проводить идентификацию сальмонелл серовариантов *Salmonella* Enteritidis и *Salmonella* Typhimurium, на долю которого приходится от 80 до 90 % сальмонеллезов. При проведении исследований нами подтверждена высокая специфичность и чувствительность используемых праймеров.

**Identification of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction. A. N. Semina., S. R. Abgarian. A. N. Semina - candidate of veterinary sciences, All-Russian research veterinary Institute of poultry. S. R. Abgarian - senior researcher All-Russian research veterinary Institute of poultry.**

#### **ABSTRACT**

Outbreaks of salmonellosis continue to occur in the Russian Federation. Each year, approximately 50,000 situations of salmonellosis are usually recorded. Death from this infection may be 0.02-0.04 per 100 thousand inhabitants. Of the salmonellae serovars available in the Russian Federation, *S. Enteritidis* takes the predominant role - 85%, followed by *S. Typhimurium* - 12%, *S. Infantis* - 10% and others - 6%. Mostly *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Gallinarum-pullorum* are most often isolated from birds. The high level of salmonellosis morbidity in poultry farming is associated with a number of factors such as: problems associated with epidemiological study of the causes of salmonellosis, the acquisition of *Salmonella* resistance to many antimicrobial drugs and, as a consequence, the lack of effective specific prevention. One of the important factors preventing the spread of *Salmonella* pathogen is the creation of diagnostic methods allowing to quickly detect the disease. The objective of the present study is to develop unique samples of oligonucleotide sequences allowing to detect DNA of microorganisms of the genus *Salmonella*. *Salmonella* serovars are difficult to genetically type because of their high degree of identity. Studies conducted in the study of *Salmonella* pathogenicity conditions have shown that for the identification of *Salmonella* strains by molecular genetic method can be used as targets of the area of pathogenicity Islands.

After analyzing the publications we have selected the gene *invA* genetic marker – gene *spvA* for the purpose of receiving a unique sequence of sequences to serovariant *S. Turek*, *S. Enteritidis*. Just the sequences of the genes *invA* and *sefA* leveled picking up similar at all serovariants *Salmonella* part, localized in the first half of the gene. With the help of the BLAST program on the NCBI server, the specificity of the selected primers was evaluated. As a result of the search in the database of sequences of GenBank revealed 100% homology of the selected primers with homologous sequences in the genome of the selected genome. The study of samples containing pathological agents of bacterial nature by PCR confirmed the specificity of the selected primers. Positive results were obtained only with samples containing *S. Turek*, *S. Enteritidis*. Thus, the selected primers can be proposed for the study of samples of different composition for the detection of the genomes.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антигенные формулы сероваров сальмонелл / Под ред. П.А.Д. Гримонт. Ф. – КсВейль, 9-е издание – Тверь: ООО издательство «Триада» 2012. - 148с.
2. Павлов С. И. Мониторинг и совершенствование специфической профилактики сальмонеллеза свиней и птиц // Дис. канд. биол. наук., Оболенск, 2004. - 105 с.
3. Погосян А. А. Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса птицы и профилактика пищевых сальмонеллезов // Автореф. дис. кандидата вет. наук. - СПб, 2011. - 23 с.
4. Чугунова Е.О., Татарникова Н.А., Прохорова Т.С., Мауль О.Г. Зараженность сальмонеллами продукции птицеводства // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6.
5. Яцышина С.Б. Выявление и типирование возбудителей сальмонеллеза молекулярно-генетическим методом. // Автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук., М., 2003, - с.- 18.

# ИНФОРМАЦИЯ

**По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятий при заразных и незаразных болезнях животных и птиц.**

**Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургской академии ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.**

**Тел/факс (812) 365-69-35,  
Моб. тел.: 8(911) 176-81-53, 8(911) 913-85-49,  
e-mail: 3656935@gmail.com**