

## РОЗДІЛ 3. ВЕТЕРИНАРНА ВІРУСОЛОГІЯ ТА МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 619:616.34-022-07:636.2-053.2

### РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ІНДИКАЦІЇ БАКТЕРІЙ РОДУ *SALMONELLA* ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ *SALMONELLA ENTERITIDIS*, *SALMONELLA DUDLIN*, *SALMONELLA GALLINARUM-PULLORUM* МЕТОДОМ ПОСТАНОВКИ ПЛР У РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ

Ареф'єв В.Л.\*

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,  
м. Харків, Україна, e.mail: vasilii.arefev@gmail.com

У статті представлено матеріали щодо можливості використання розроблених праймерних систем для індикації та ідентифікації генетичного матеріалу сальмонел як за умов класичної ПЛР, так і при використанні методу ПЛР у реальному часі із застосуванням інтеркалюючого барвника SYBR Green. Запропоновані протоколи для індикації та ідентифікації генетичного матеріалу *Salmonella spp.*, *S. enteritidis*, *S. Dublin*, *S. gallinarum-pullorum* для універсального використання за умов класичної полімеразної ланцюгової реакції та ПЛР у режимі реального часу.

**Ключові слова:** сальмонела, генотипування, ПЛР у режимі реального часу, експрес-методи діагностики.

Сальмонельоз це найактуальніша проблема сьогодення у різних галузях як ветеринарної, так і гуманної медицини. Великих втрат захворювання на сальмонельоз завдає у промислового тваринництва та птахівництва [5, 4]. Окремою великою проблемою також є контамінація сальмонелами різних об'єктів, зокрема кормів, обладнання, продуктів харчування, сировини для їх виготовлення. Сальмонели вже давно асоціюються із харчовими токсикоінфекціями людини. У всьому світі реєструється щорічно близько 90 мільйонів випадків гастроентеритів, причиною яких є *Salmonella* [2, 7, 8].

Також є дані із різних світових джерел про те, що щорічне захворювання на сальмонельоз у світі може коливатися від 80,3 мільйонів випадків до 200 мільйонів і навіть сягати 1,3 млрд. випадків щорічно [3, 6].

Сьогодні має велике значення для практики застосування експрес-методів виявлення контамінації сальмонелами різних об'єктів. Основою таких методів є різні варіанти застосування полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яка завдяки високій чутливості та експресності підходить для ветеринарно-санітарного контролю якості та безпечності кормів, продукції тваринництва та харчових продуктів. ПЛР застосовується як у класичному виконанні із обліком результатів за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, так і у більш сучасній модифікації – ПЛР у форматі реального часу.

Цей різновид ПЛР має за основу вимір флуоресцентного сигналу в кожному циклі ампліфікації. Інтенсивність сигналу пропорційна концентрації кінцевого продукту ПЛР [1, 11].

**Мета роботи.** Адаптація розроблених раніше праймерних систем для універсального використання як для класичної ПЛР з електрофоретичною детекцією результатів, так і для ПЛР у форматі реального часу із застосуванням інтеркалюючого барвника.

**Матеріали та методи.** Під час досліджень використовували праймери для індикації та видової ідентифікації генетичного матеріалу сальмонел у режимі класичної мультиплекс – ПЛР (таблиця 1) [9, 10].

**Таблиця 1** – Олігонуклеотидні послідовності праймерів, які використовувалися для досліджень.

Таргетний ген	Сероваріант сальмонел	Назва праймера	Послідовність олігонуклеотидів 5'-3'	Розмір ПЛР продукту
invA	<i>Salmonella spp.</i>	Salm 3	GCTGCGCGAACGGCGAAG	387
		Salm 4	TCCCGCCAGAGTCCCAT	
sefA	<i>Salmonella enteritidis</i>	Sent F	AAATGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG	299
		Sent R	GTTTCGTTCTCTGGTACTTACGATGAC	
SeD_A1104	<i>Salmonella Dublin</i>	Sdub_F	ACGCGAAATCTGATGGTCTT	203
		Sdub_R	GCCACCAGTTGTGAAAGGC	

### Розділ 3. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

SG0266	<i>Salmonella Gallinarum-pullorum</i>	Sgal_F	CCGCACAACACATCAGAAAG	97
		Sgal_R	AGCTGCCAGAGGTTACGCTG	

В якості позитивних контрольних зразків використовували ДНК, одержану із референтних штамів *S. enteritidis*, *S. Dublin* та *S. gallinarum-pullorum*. Реакційну суміш готували з використанням інтерколюючого барвника у спеціальних пластикових пробірках із оптичними кришками наступного складу:

- SYBR Green – 12,5 мкл;
- Primers F+R – 1+1 мкл;
- DNA simple – 5 мкл;
- dH<sub>2</sub>O – 5,5 мкл.

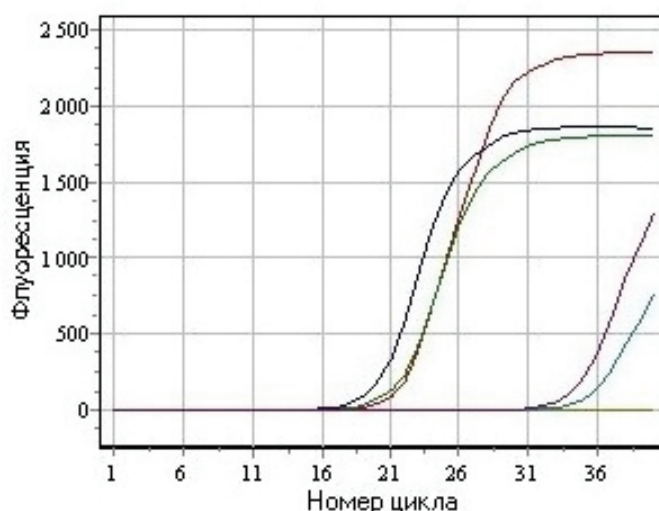
Для проведення досліджень використовували ампліфікатор DTlite виробництва ООО «НПО ДНК-Технологія». Зчитування результатів проводили за допомогою каналу FAM.

**Результати досліджень.** На першому етапі ми проводили реакцію ампліфікації з використанням протоколу, який був адаптований для проведення класичної ПЛР (таблиця 2).

**Таблиця 2 –** Режими ампліфікації для класичної ПЛР

Етапи ПЛР	Температура	Час	Кількість циклів
Первинна денатурація	95 °C	2 хв.	1
Денатурація	95 °C	1 хв.	40
Відпал	60 °C	1 хв.	
Елонгація	72 °C	1 хв.	
Фінальна елонгація	72 °C	4 хв.	1

За таких умов достатню для детекції кількість продуктів ампліфікації ми одержували починаючи із 16–20 циклу у трьох із чотирьох позитивних зразків. Також починаючи з 31 циклу відбулося неспецифічне напрацювання ПЛР-продукту у двох із трьох проб з негативними контрольними зразками (рис. 1). Проте неспецифічність була елімінована методом ent-off на рівні флуоресценції 1300.



**Рис. 1.** Графік залежності флуоресценції каналу FAM від номеру циклу за режиму класичної ПЛР.

Для усунення цих недоліків було прийнято рішення відкоригувати режими ампліфікації у бік зменшення часу денатурації, відпалу, елонгації та зменшити кількість ампліфікаційних циклів із 40 до 35 (таблиця 3).

Разом з тим, точку детектування результатів було перенесено на етап фінальної елонгації (рис. 2).

Таблиця 3 – Відкоригований режим ампліфікації для ПЛР у реальному часі

Етапи ПЛР	Температура	Час	Кількість циклів
Первинна денатурація	95 °С	2 хв.	1
Денатурація	95 °С	30 с.	35
Відпал	60 °С	30 с.	
Елонгація	72 °С	20 с.	
Фінальна елонгація	72 °С	12 с.	1

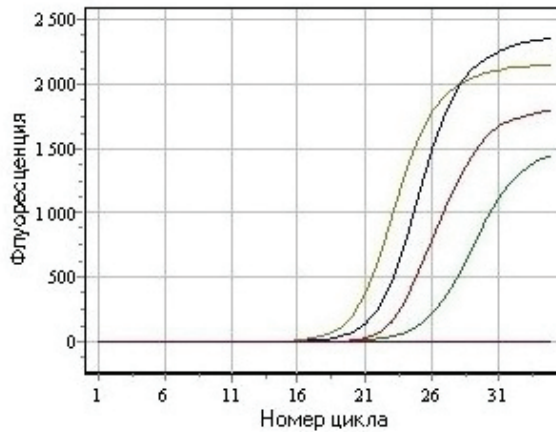


Рис. 2. Графік залежності флуоресценції каналу FAM від номеру циклу за умов відкоригованого режиму ампліфікації

У результаті проведених змін ми отримали чіткий результат детектування продуктів ампліфікації від 16 до 21 циклу. У негативних контрольних зразках неспецифічна ампліфікація була відсутня.

Для підтвердження результатів, які ми отримали за допомогою постановки ПЛР у режимі реального часу, було проведено з напрацьованими ампліконами паралельний облік реакції за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Результати наведені на рисунку 3.

Паралельний облік результатів показав, що за відпрацьованих режимів ампліфікації відбувається напрацювання специфічного ПЛР-продукту відповідної довжини, що складає для *Salmonella spp.* – 378 п.н., *S. Enteritidis* – 299 п.н., *S. Dublin* – 20 п.н., *S. gallinarum-pullorum* – 97 п.н.

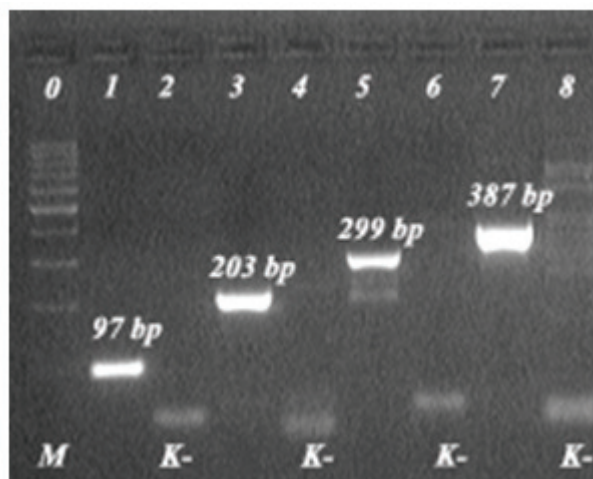


Рис. 3. Електрофореграма результатів паралельного детектування ПЛР продукту у агарозному гелі. Трек № 1 – Sgal F\_R – 97 п.н.; трек № 3 – Sdub F\_R – 203 п.н.; трек № 5 – Sent F\_R – 299 п.н., трек № 7 – Salm 3\_4, треки №№ 2, 4, 6, 8 – негативні контроли

**Висновки.** У сучасних економічних умовах існує необхідність розробки та впровадження універсальних методик, які можуть бути використані у лабораторіях із різним рівнем технічного оснащення. Відпрацьовано методику виявлення ДНК сальмонел у вигляді готового протоколу дослідження, яка може бути використана як для постановки класичної ПЛР, так і для ПЛР у режимі реального часу при індикації та ідентифікації найбільш важливих представників роду *Salmonella* у ветеринарній практиці. За допомогою представленої методики є можливість виявляти генетичний матеріал *Salmonella* spp., а також проводити генотипування декількох серологічних варіантів: *S. enteritidis*, *S. Dudlin*, *S. gallinarum-pullorum* за допомогою ПЛР у форматі реального часу та класичної полімеразної ланцюгової реакції.

#### Список літератури

1. Bustin S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays [Text] / S. A. Bustin // Journal of Molecular Endocrinology – 2000 – 25: 169-193
2. Campioni F. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil [Text] / Moratto Bergamini AM, Falcão JP // Food Microbiol – 2012 – 32: 254–264.
3. Coburn, B. *Salmonella*, the host and disease: A brief review. [Text] / Grassl, G.A.; Finlay, B.B. // Immunol. Cell Biol. – 2006 – 85, 112–118.
4. Gonzales-Barron UA. A risk characterization model of *Salmonella* Typhimurium in Irish fresh pork sausages [Text] / Redmond G, Butler F // Food Res Int – 2012 – 45: 1184–1193.
5. Liu W. Diversity of *Salmonella* isolates using serotyping and multilocus sequence typing [Text] / B. Liu, X. Zhu, S. Yu, X. Shi // Food Microbiol – 2011 – 28:1182–1189.
6. International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. [Text] / J. Musto, E. Scallan, F.J. Angulo, M. Kirk, et al. // Clin. Infect. Dis. – 2010 – 50, 882–889.
7. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. [Text] / Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, et al. // Clin Infect Dis: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America – 2010 – 50:882–889.
8. Visscher C.F. Serodiversity and serological as well as cultural distribution of *Salmonella* on farms and in abattoirs in Lower Saxony, Germany [Text] / Klein G, Verspohl J, Beyerbach M, Stratmann-Selke J, et al. // Int J of Food Microbiol – 2011–146:44–51.
9. Арефьев В.Л. Разработка методики индикации ДНК сальмонелл и идентификации серологических вариантов *Salmonella* Enteritidis и *Salmonella* Typhimurium на основе полимеразной цепной реакции. [Текст] / В.Л. Арефьев // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Харків – 2012. — Вип. 96 – с. 77-80.
10. Ареф'єв В.Л. Розрахунок олігонуклеотидних послідовностей для генотипування окремих представників роду *Salmonella*. [Текст] / Герілович А.П // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Харків – 2013. — Вип. 97 – с. 56-58.
11. ПЦР в реальном времени [Текст]: учебное пособие/Ребриков Д.В. [и др.]; под общей редакцией д.б.н. Д.В. Ребрикова – 3-е издание – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 223 с.

#### ELABORATION OF THE METHODOLOGY FOR BACTERIA OF THE GENUS SALMONELLA DETECTION AND IDENTIFICATION OF THE GENETIC MATERIAL OF SALMONELLA ENTERITIDIS, SALMONELLA DUDLIN, SALMONELLA GALLINARUM-PULLORUM BY REAL-TIME PCR

**Aref'ev V.L.**

*National Science Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine*

*The aim of the work. Optimization of previously developed primer systems for common use as a classical PCR electrophoretic detection and for real-time PCR using the intercalating dye.*

*Materials and methods. Material for our research were the primers used for display and species identification of the genetic material of Salmonella in the classical mode multiplex – PCR.*

*As a positive control samples extracted DNA from reference strains of S. enteritidis, S. Dudlin, S. gallinarum-pullorum were used. To prepare the reaction mixtures used intercalation dye SYBR Green. To conduct research using a thermal cycler DTLite produced by «DNA-Technology Research.» Results detection was carried out in FAM channel.*

*Results. As a result it was optimized real-time PCR protocol using the primer systems Sgal F\_R – to identify the genetic material of S. gallinarum-pullorum, Sdub F\_R – to identify the genetic material S. Dudlin, Sent F\_R – to identify the genetic material S. enteritidis, Salm 3\_4 – identifying the genetic material for Salmonella spp. The obtained results confirmed the parallel detection of PCR products by electrophoresis in agarose gel.*

*Conclusions. Elaborated method that was used in this study can be used as classical PCR, and the real-time PCR for the detection and identification of the most important representatives of the genus Salmonella in the veterinary practice. Using the presented techniques it was shown the ability of detection of the genetic material of Salmonella spp., as well as to carry out genotyping several serological groups: S. enteritidis, S. Dudlin, S. gallinarum-pullorum using real-time PCR and classical PCR.*

**Keywords:** salmonella, genotyping, real-time PCR, express-diagnostic.