

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *S. ENTERICA*

С.М. Бармак 

ТОО «Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности», г. Алматы, Казахстан
sabyr95@mail.ru

Аннотация. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) стала широко используемым инструментом обнаружения, идентификации и дифференциации патогенных микроорганизмов при диагностике заболеваний человека и животных. Частые вспышки сальмонеллы, связанные с продуктами питания, требуют необходимости разработки методов быстрого обнаружения для контроля распространения заболевания. ПЦР в режиме реального времени (ПЦР РВ) позволяет обнаружить наличие ДНК патогенов. Обнаружение сальмонеллы в ПЦР РВ проводилось с использованием разработанных праймеров SInv-1F, SInv-1R и зонда SE-Probe. Положительные результаты были получены при тестировании на специфичность ПЦР РВ тест системы для обнаружения *S. enterica* при использовании в качестве матриц ДНК бактерии *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *S. Virchow*. Разработанная ПЦР РВ тест система для обнаружения ДНК *S. enterica* протестирована на ДНК гетерологичных микроорганизмов родов *Pasterella*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Mycoplasma*, *Candida* и *Aspergillu*. Гетерологичные микроорганизмы показали отрицательный результат при тестировании разработанной ПЦР РВ. ПЦР РВ тест система позволяет выявлять ДНК *S. enterica* в пределах 1-10 микробных клеток. Разработанная ПЦР РВ тест система позволила определить 99 (9,7 %) изолятов *S. enterica* в результате исследования 1020 биологических образцов (883 образцов из пищевых продуктов и 137 образцов клинического материала), собранных в 2018-2019 гг. Диагностическая эффективность тест-системы «ПЦР РВ *S. enterica*» составила 100 %.

Ключевые слова: ПЦР РВ; *S. enterica*; праймер; зонд; специфичность; чувствительность

Введение

Небрюшнотифозная сальмонелла (НТС) является причиной пищевых инфекций человека, таких как гастроэнтерит и бактериемия [1, 2]. Во многих частях мира постоянно регистрируются вспышки болезней пищевого происхождения, вызванных сальмонеллой [3, 4]. В настоящее время идентифицировано более 2500 серотипов *S. enterica*, однако большинство инфекций у человека вызываются ограниченным числом серотипов [5].

Заболевания пищевого происхождения, вызываемые НТС, представляют собой важную проблему общественного здравоохранения и экономическое бремя во всем мире [6]. В Европе ежегодно регистрируется более 100 000 случаев сальмонеллеза у людей [7]. Серовары сальмонеллы, связанные с гастроэнтеритом, передаются фекально-оральным путем, либо

напрямую, либо через зараженную пищу или воду [8]. Инфекции гастроэнтерита, вызванные НТС, в большинстве случаев проходят самостоятельно, и антимикробное лечение обычно не требуется. Однако у 3–10% людей с желудочно-кишечными заболеваниями, вызванными НТС, развивается бактериемия [9] - серьезное и потенциально смертельное состояние, требующее противомикробного лечения [8].

По мере дальнейшего развития управления безопасностью пищевых продуктов микробиологическое тестирование будет продолжать играть важную роль в оценке достижения целей безопасности пищевых продуктов. Однако традиционные микробиологические методы, основанные на культурах ограничены, особенно в их способности предоставлять своевременные данные. Появление биотехнологии привело к появлению новых технологий, которые привели к разработке методов быстрой диагностики и изменению практики тестирования пищевых продуктов. Серологические методы по-прежнему остаются важными инструментами предотвращения попадания патогенов пищевого происхождения в пищу человека через мясо и молоко животных. Одним из основных применений быстрых методов является быстрый скрининг большого количества образцов, при этом ожидается, что большинство из них будут отрицательными, что приведет к более быстрому выпуску продукта в продажу [10]. Традиционные методы культивирования для обнаружения сальмонеллы в пищевых продуктах состоят из ряда этапов, которые включают неселективное обогащение, селективное обогащение, селективное/дифференциальный посев и, наконец, биохимическое и серологическое подтверждение. Метод трудоемкий и требует минимум 5 дней для завершения анализа [11]. Следовательно, существует необходимость в разработке и проверке более быстрых методов скрининга и обнаружения этого патогена в продукции.

В этом исследовании была оценена эффективность ПЦР РВ молекулярного метода выявления сальмонеллы в сравнении с микробиологическим методом обнаружения сальмонеллы. По сравнению с традиционным методом культивирования анализ ПЦР РВ позволил быстрее и одинаково точно обнаружить виды *Salmonella*.

Материалы и методы

Сбор клинического материала и образцов продуктов питания

С целью выявления степени заражения различных продуктов питания, реализуемых в торговых сетях в 2018 - 2019 гг. было собрано 883 проб различных образцов пищевого сырья и продуктов питания, подозреваемые в качестве фактора передачи возбудителя инфекции, а также 137 проб клинического материала от больных детей.

Штаммы и изоляты микроорганизмов, использованные в работе

Для определения специфичности реакции использовали референтные штаммы сальмонелл и других бактерий: *S. Enteritidis* (S.e-0071), *S. Typhimurium* TA 98 (reference strain), *S. Typhimurium* (S.t-0072), *S. Virchow* (reference strain), *S. Infantis* (S.i-0073), *S. Abortusovis* 37, *S. Gallinarum* 65, *S. Abortus equi* 17, *S. Cholera-suis* 51, *S. Dublin* 31, *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*, *Clostridium perfringens* Strain S 107, *Clostridium sporogenes* NCTC 532, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* Strain Boston 41501, *Pseudo-monas aeruginosa*, *Candida albicans* 3147, *Mycoplasma hyorhinis* BTS-7, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* WVU 1853, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus brasiliensis*.

Выделение ДНК из бактерий Salmonella тризольным методом.

Выделение ДНК из бактерий *Salmonella* проведено с использованием коммерческого реагента TRIzol ("Invitrogen", США) в соответствии с инструкцией производителя.

Подбор и синтез специфических олигонуклеотидов для постановки ПЦР РВ

Общее требование к подбору олигонуклеотидов состоит в том, что праймеры должны иметь сходные температуры плавления ($T_{пл}$) и сбалансированное содержание ГЦ пар, должны избегать самокомплементарности и структуры шпильки. Пара праймеров амплифицирует только предполагаемую мишень, но не какие-либо непреднамеренные мишени. Это особенно важно для количественной ПЦР РВ, где во многих случаях количество продукта ПЦР представляется общей интенсивностью флуоресценции, включенной в амплифицированную ДНК [12]. Для разработки ПЦР РВ сконструированы специфичные для *S. enterica* праймеры SInv-1F, SInv-1R и зонд SE-Probe.

Для подбора и анализа праймеров и зондов для ПЦР использован коммерческий программный пакет для биоинформатики Vector NTI Advance 11 (ThermoFisher, США). Специфичность праймеров и зондов проверена с использованием биоинформатической программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) для поиска базового локального сходства между последовательностями. Выбранные праймеры и зонды были синтезированы в научно-производственной компании «Синтол», Россия.

Постановка ПЦР РВ для идентификации сальмонеллы

ПЦР РВ для идентификации сальмонелл проводили с использованием прибора термоциклер Rotor Gene Q (Qiagen, Германия). При постановке ПЦР РВ использованы праймеры и зонды специфичные для бактерии *S. enterica* (SE-F, SE-R, SE-Probe).

Для амплификации ДНК бактерии *S. enterica* использовали реакционную смесь объемом 25 мкл, состоящую из:

х10 ПЦР буфер	- 2,5 мкл
дНТФ смесь (10 мМ)	- 0,5 мкл
MgCl ₂ (25 мМ)	- 1 мкл
Праймер F (10 пмоль)	- 1 мкл
Праймер R (10 пмоль)	- 1 мкл
Зонд-FAM (5 пмоль)	- 1 мкл
ДНК	- 3 мкл
Taq ДНК полимеразы (5 Ед)	- 0,2 мкл
Деионизированная вода	до 25 мкл

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

пре-денатурация	95 °C - 3 мин	
денатурация	94 °C - 30 с	} 45 циклов
отжиг	57 °C - 20 с	

Результаты

Сальмонеллы являются одними из наиболее распространенных патогенов пищевого происхождения. Быстрая идентификация этиологических агентов во время вспышек заболеваний пищевого происхождения имеет большое значение. Высокая распространенность сальмонеллы требует эффективных и действенных подходов к ее выявлению, обнаружению и мониторингу на ранней стадии.

Ген *Inv*, имеется у штаммов всех подвигов *S. enterica*. Эта область хромосомы сальмонелл была приобретена сальмонеллами в результате горизонтального переноса еще до дифференциации на серовары внутри *S. enterica*, а не в результате последующего переноса между штаммами различных сероваров, поэтому характерные мутации локализованных в них генов можно считать генетическим маркером *S. enterica* [13]. Праймеры были спроектированы с использованием программы Vector NTI Suite 9 (Invitrogen) и исследованы с использованием программы BLAST, для подтверждения их специфичности. В результате исследований было сгенерировано специфические праймеры и зонд на ген *Inv* для *S. enterica*.

В ходе экспериментов были отобраны оптимальные пара праймеров и зонд, которые были обозначены SE- Probe, SInv-1F и SInv-1R для *S. enterica*.

В качестве флуоресцентного красителя (флуорофора) использовали FAM ($\lambda_{\text{макс. поглощения}}$, 490 нм, $\lambda_{\text{макс. флуоресценции}}$, 520 нм). Гаситель флуоресценции - BHQ1 ($\lambda_{\text{макс. поглощения}}$, 535 нм, $\lambda_{\text{макс. флуоресценции}}$, 480-580 нм).

Оптимизация метода ПЦР РВ для выявления *S. enterica*

В результате исследования определены, что специфические продукты оптимально нарабатываются при концентрациях праймеров SInv-1F и SInv-1R по 10 пмоль. Результаты ПЦР РВ анализа показали, что флуоресцентный зонд SE-Probe хорошо работает при концентрации 5 пмоль. Наиболее оптимальной концентрацией Mg^{2+} является 1 мМ. Подобранная экспериментальным путем конечная концентрация дНТФ составляет 0,2 мМ. Оптимальная активность фермента Taq ДНК полимеразы составляет 0,04 ед.

Результаты оптимизации метода ПЦР РВ для выявления *S. enterica* показали, что разработанная тест-система работает специфично с ДНК бактерии *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *S. Virchow*. Результаты представлены на рисунке 1.

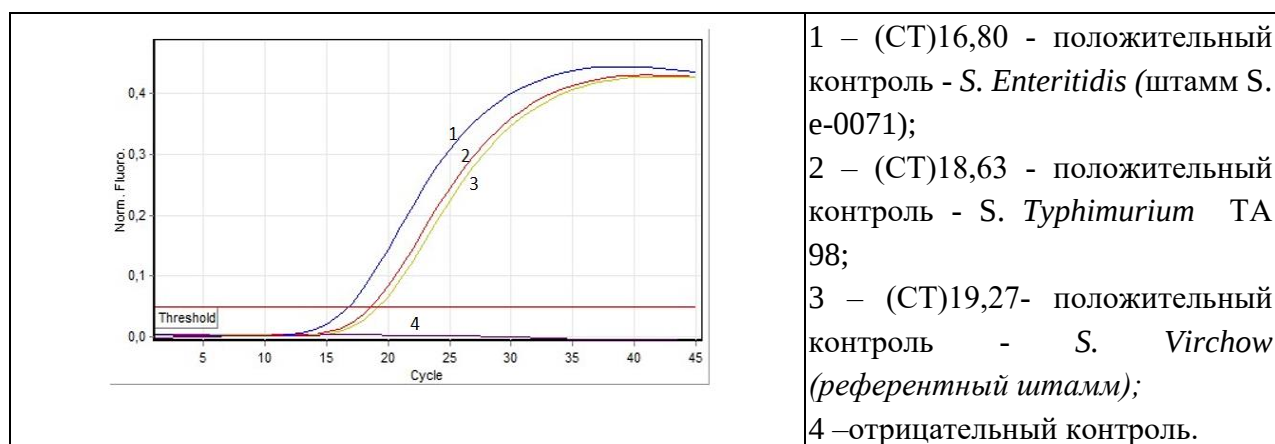
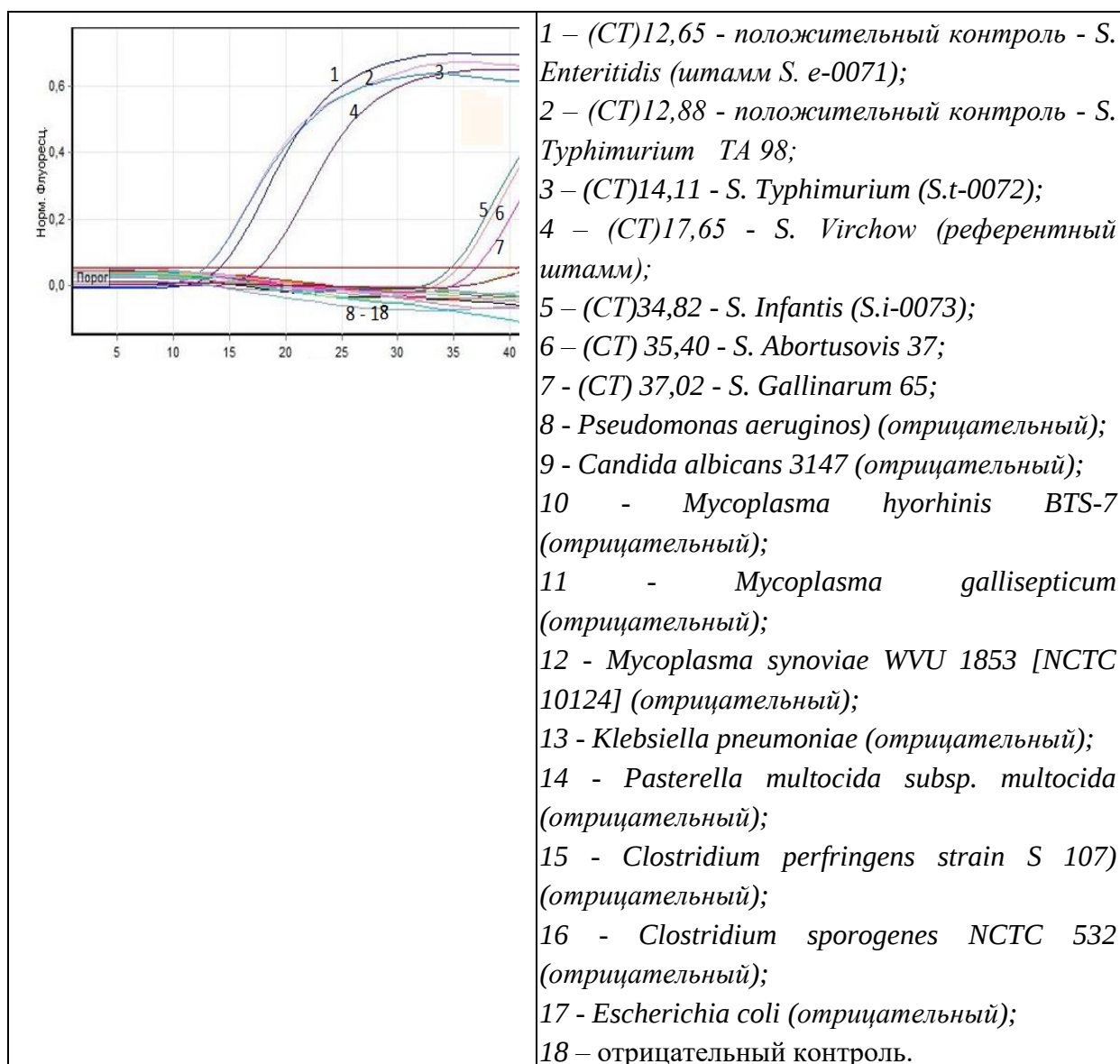


Рисунок 1 – Кривые флуоресценции накопленных продуктов при выявлении *S. enterica* в ПЦР РВ

При выявлении *S. enterica* в ПЦР-РВ пороговые циклы (CT) составили: для положительных контролей - *S. Enteritidis* (штамм S. e-0071) - (CT) 16,80; *S. Typhimurium* TA 98 - (CT) 18,63; *S. Virchow* - (CT) 19,27.

Определение специфичности метода ПЦР РВ для выявления *S. enterica*

Специфичность используемых олигонуклеотидных праймеров и зонда была подтверждена тестированием на панели из 10 контрольных организмов *Salmonella* (*S. Enteritidis* (S.e-0071), *S. Typhimurium* TA 98 (референтный штамм), *S. Typhimurium* (S.t-0072), *S. Virchow* (референтный штамм), *S. Infantis* (S.i-0073), *S. Abortusovis* 37, *S. Gallinarum* 65, *S. Abortus equi* 17, *S. Cholera suis* 51, *S. Dublin* 31). Тесты показали высокую аналитическую специфичность при выявлении *S. enterica* и его серотипов. Результаты представлены на рисунке 2.



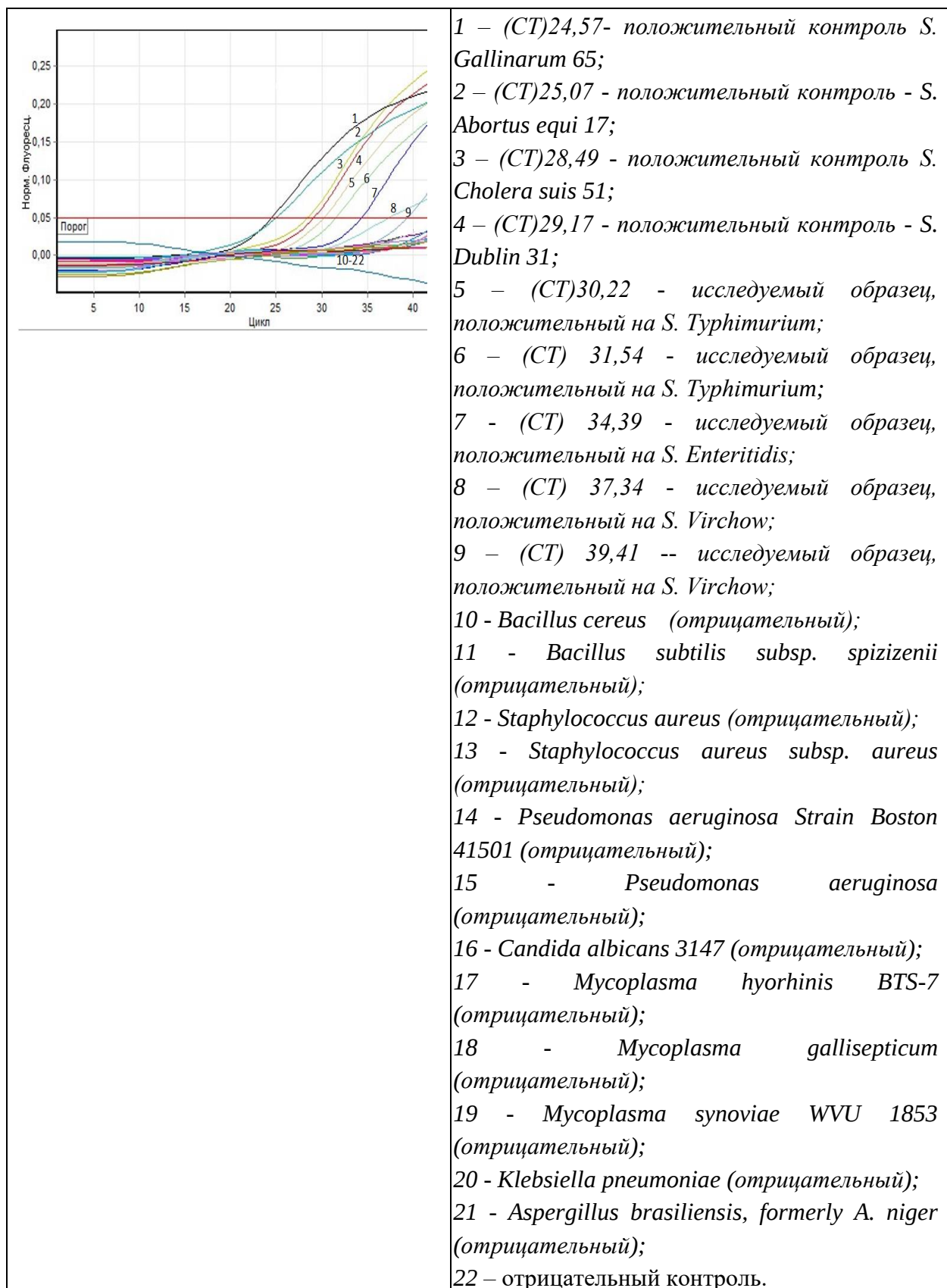


Рисунок 2 – Кривые флуоресценции накопленных продуктов при определении специфичности ПЦР РВ для выявления *S. enterica*

Отрицательные результаты были получены при использовании в качестве матриц ДНК гетерологичных микроорганизмов других родов: *Pasterella*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Mycoplasma*, *Candida* и *Aspergillus*.

Определение чувствительности метода ПЦР РВ для выявления *S. enterica*

При определении чувствительности метода ПЦР РВ для выявления *S. enterica* пределы обнаружения рассчитаны путем амплификации фрагментов ДНК, выделенных из серии 10-кратных разведений бактериальных сальмонеллезных клеток. Диапазон линейных измерений составил 1000, 100, 10 и 1 микробных клеток/мл целевой последовательности. ДНК, выделенные из перечисленных образцов, протестированы с использованием разработанного метода ПЦР РВ для выявления *S. enterica*. Результаты исследования представлены на рисунке 3.

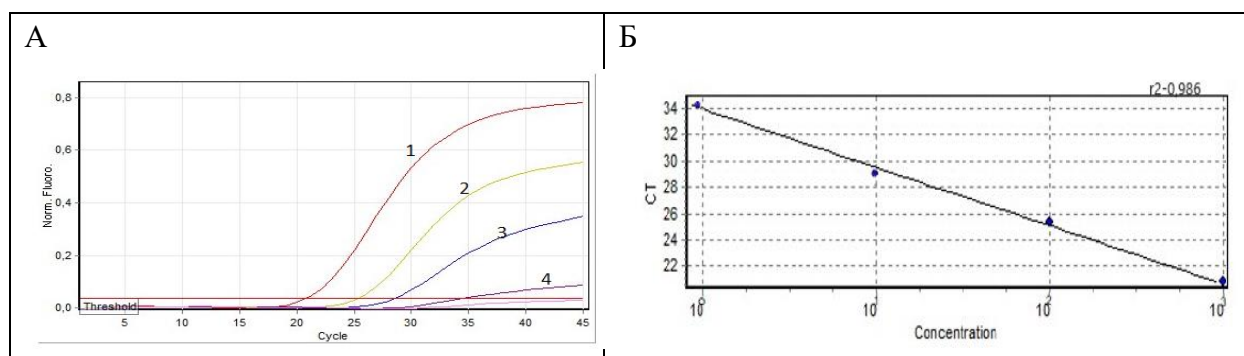


Рисунок 3 – Оценка предела чувствительности метода ПЦР РВ при тестировании последовательных 10-кратных разведений микробных клеток/мл бактерии *S. enterica* (А).

Линейная регрессия результатов ПЦР-РВ при тестировании 10-кратных разведений микробных клеток/мл бактерии *S. enterica* (Б).

На рисунке 3А представлены результаты оценки предела чувствительности ПЦР РВ тест-системы при тестировании последовательных 10-кратных разведений микробных клеток/мл бактериальной суспензии. На рисунке 3Б изображены линейные регрессии средних значений пороговых циклов СТ при тестировании 10-кратного разведения бактериальной суспензии. Для оценки эффективности амплификации тест-системы проведено тестирование ДНК, выделенных из 10-кратных разведений образцов в концентрациях 1000, 100, 10 и 1 микробных клеток.

Количество ДНК сальмонеллы, выделенные из 1000 (СТ 20,83), 100 (СТ 25,35), 10 (СТ 28,53) и 1 (СТ 34,49) микробных клеток/мл бактериальной суспензии в образце коррелировал со значением порогового цикла (СТ), где корреляция Пирсона для *S. enterica* составила $r = 0,996$. Положительными считаются пробы, у которых порог СТ меньше 38-го цикла. Данный метод позволяет выявлять ДНК *S. enterica* в пределах 1-10 микробных клеток.

Оценка диагностической эффективности ПЦР РВ тест-системы

Для оценки диагностической эффективности ПЦР РВ тест-системы при выявлении *S. enterica*, были проанализированы 1020 биологических образцов (883 образца пищевых продуктов и 137 образцов клинического образца) (таблица 1).

Таблица 1 – Выявление *S. enterica* в образцах с использованием различных тестов

Тест	Истинный положительный (ИП)	Ложнополо- жительный (ЛП)	Ложноотри- цательный (ЛО)	Истинный отрицательный (ИО)	Общее
ПЦР РВ <i>S. enterica</i>	99 (9.70%)	0	0	921 (90,30 %)	1020 (100 %)
Культивирование <i>S. enterica</i>	99 (9.70 %)	0	0	921 (90,30 %)	1020 (100 %)
Тест-система «ГенТест Сальмонеллез»	98 (9.61 %)	0	1 (0.10%)	922 (90,39 %)	1020 (100 %)

В результате проведенных исследований из 1020 образцов, полученных из клинического материала, пищевого сырья и продуктов питания с использованием теста «ПЦР РВ *S. enterica*» и метода «культивирование *S. enterica*» были выделены бактерии сальмонеллы в 99 (9.70%) образцах и в 921 (90,30 %) образцах получен отрицательный результат. Таким образом, тест-система «ПЦР РВ *S. enterica*», показала 100% выявление бактерии *S. enterica*.

При использовании коммерческой тест-системы «ГенТест Сальмонеллез» положительным на сальмонеллу были 98 (9.61 %) образцов, ложноотрицательными 1 (0.10%) образца.

Тест-система «ПЦР РВ *S. enterica*» и метод «культивирование *S. enterica*» как эталон показали 100 % диагностическую эффективность.

Обсуждение

Сальмонелла является одной из основных причин пищевых отравлений во всем мире. Сальмонеллы могут загрязнять самые разнообразные пищевые продукты, включая продукты животного происхождения, такие как яйца, молочные продукты или мясо. Одной из основных проблем, связанных с сальмонеллой, являются экономические потери из-за уничтожения зараженных продуктов питания.

Разработка ПЦР РВ для специфического выявления *S. enterica* была основана на маркере гена *Inv*, выбранном в настоящем исследовании. Были разработаны праймеры SInv-1F, SInv-1R и зонд SE-Probe, амплифицирующие и нацеленные на этот маркер. Разработанный ПЦР РВ для специфического выявления *S. enterica* был успешно протестирован на ДНК гетерологичных микроорганизмов других родов: *Pasterella*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Mycoplasma*, *Candida* и *Aspergillus*, использованных для тестов на специфичность. Положительные результаты были получены при использовании в качестве матриц ДНК бактерии *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *S. Virchow* и др.

Для оценки чувствительности ПЦР РВ тест-системы проведено тестирование ДНК, выделенных из 10-кратных разведений образцов в концентрациях 1000, 100, 10 и 1 микробных клеток. Тест система позволяет выявлять ДНК *S. enterica* в пределах 1-10 микробных клеток.

Разработанная ПЦР РВ тест система позволила определить вид *S. enterica* бактерии сальмонелла. В результате исследования 1020 биологических образцов (883 образцов из пищевых продуктов и 137 образцов клинического материала), собранных в 2018-19 гг. было выявлено 99 изолятов *S. enterica* разработанным ПЦР РВ тестом и методом культивирования.

Метод культивирования *S. enterica* использован как эталон и показал 100 % диагностическую эффективность. Результаты, полученные с помощью разработанной тест-системой «ПЦР РВ *S. enterica*», подтверждены выделением сальмонеллы в чувствительной среде, что свидетельствует о надежности используемого метода ПЦР РВ при выявлении сальмонелл. Диагностическая эффективность тест-системы «ПЦР РВ *S. enterica*» составила 100 %.

Заключение

Сконструированы специфические олигонуклеотиды и разработана ПЦР РВ тест-система для выявления геномной ДНК *S. enterica* в продуктах питания и клиническом материале. Аналитическая чувствительность метода составила 1 - 10 микробных клеток/мл. Диагностическая эффективность метода составила 100%. В результате исследования 1020 биологических образцов было выявлено разработанной ПЦР РВ тест-системой и выделено методом культивирования 99 (9,7 %) изолятов *S. enterica*.

Литература

1. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC. Global monitoring of Salmonella serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007// *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8: - P. 887–900.
2. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL. Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens // *Emerg Infect Dis.* 2011;17: -P. 7–15.
3. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ. The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis // *Clin Infect Dis.* 2010;50: -P. 882–889.
4. European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention and Control The European Union One Health 2018 Zoonoses Report // 5926EFSA J. 2019; -P. 17
5. Judd MC, Hoekstra RM, Mahon BE, Fields PI, Wong KK. Epidemiologic patterns of human Salmonella serotype diversity in the USA // 1996-2016. *Epidemiol Infect.* 2019; -P. 147-187.
6. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ. The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis // *Clin. Infect. Dis.* 2010; 50: -P. 882–889. 10.1086/650733
7. EFSA-European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011 // *EFSA Journal.* 2013; 11: -P. 250
8. Hohmann EL. Nontyphoidal Salmonellosis // *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32: - P. 263–269.
9. Okeke IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, O'Brien TF. Antimicrobial resistance in developing countries // Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect. Dis.* 2005; 5: - P. 481–493.
10. Hoorfar J. Rapid detection, characterization, and enumeration of foodborne pathogens // *APMIS Suppl.* 2011 Nov;(133): -P. 1-24. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02767.x. PMID: 22250747.

11. Hammack T. S., Valentin-Bon I. E., Jacobson A. P., Andrews W. H. Relative effectiveness of the Bacteriological Analytical Manual method for the recovery of *Salmonella* from whole cantaloupes and cantaloupe rinses with selected preenrichment media and rapid methods // J. Food. Prot. – 2004. 67: -P. 870–877.

12. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // BMC bioinformatics. – 2012. – T. 13. – C. 1-11.

13. Яцыщина С.Б. Выявление и типирование возбудителей сальмонеллеза молекулярно-генетическими методами // Автореферат канд. диссертации, - 16.00.03, - 2003 г.

References

1. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, et al. (2011) Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis* pp.887–900.

2. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. (2011) Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens. *Emerg Infect Dis*. pp. 7–15.

3. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. (2010) The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*. pp. 882–889.

4. European Food Safety Authority. (2019) European Centre for Disease Prevention and Control The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. 5926EFSA J. 17

5. Judd MC, Hoekstra RM, Mahon BE, Fields PI, Wong KK. (2019) Epidemiologic patterns of human *Salmonella* serotype diversity in the USA, 1996-2016. *Epidemiol Infect*. 147:e187.

6. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. (2010) The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis*. pp. 882–889. 10.1086/650733

7. EFSA-European Food Safety Authority. (2013) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*.; 11: 250

8. Hohmann EL. (2001) Nontyphoidal Salmonellosis. *Clin. Infect. Dis*. 32: pp. 263–269.

9. Okeke IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, O'Brien TF, et al. (2005) Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect. Dis*. 5: pp. 481–493.

10. Hoorfar J. (2011) Rapid detection, characterization, and enumeration of foodborne pathogens. *APMIS Suppl*. 133:1-24. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02767.x. PMID: 22250747.

11. Hammack T. S., Valentin-Bon I. E., Jacobson A. P., Andrews W. H. (2004) Relative effectiveness of the Bacteriological Analytical Manual method for the recovery of *Salmonella* from whole cantaloupes and cantaloupe rinses with selected preenrichment media and rapid methods. *J. Food. Prot*. 67: pp.870–877.

12. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*. T. 13. – C. 1-11.

13. Yacyshchina S.B. (2003) Vyyavlenie i tipirovanie vozbuditelej sal'monelleza molekulyarno-geneticheskimi metodami. Avtoreferat kand. dissertacii.

S. ENTERICA БАКТЕРИЯСЫН АНЫҚТАУ ҮШІН НАҚТЫ УАҚЫТТАҒЫ ПОЛИМЕРАЗДЫ ТІЗБЕКТІ РЕАКЦИЯ ӘДІСІН ЖАСАУ

С.М. Бармак 

«Қазақ қайта өңдеу және тағам өнеркәсіптері ғылыми-зерттеу институты» ЖШС,
Алматы, Қазақстан
sabyr95@mail.ru

Аннотация. Полимеразды тізбекті реакция (ПТР) адам мен жануарлардың ауруларын балауда патогенді микроорганизмдерді анықтау, айқындау және саралау үшін кеңінен қолданылатын құрал болып табылады. Азық-түлікпен байланысты сальмонеллалардың жиі өршуі аурудың таралуын бақылау үшін жылдам анықтау әдістерін әзірлеуді талап етеді. Нақты уақыттағы ПТР патогендердің ДНҚ-ның болуын анықтай алады. Сальмонеллаларды нақты уақыттағы ПТР арқылы анықтау, әзірленген SInv-1F, SInv-1R праймерлер және SE-Probe зондының көмегімен жүзеге асырылды. Үлгі ретінде *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* және *S. Virchow* бактерияларының ДНҚ-сын пайдаланып *S. enterica* бактериясын анықтауға арналған нақты уақыттағы ПТР тест жүйесінің ерекшелігін сынау кезінде оң нәтижелер алынды. *S. enterica* ДНҚ анықтауға арналып әзірленген нақты уақыттағы ПТР тест жүйесі *Pasterella*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Mycoplasma*, *Candida* және *Aspergillus* тектерінің гетерогенді микроорганизмдерінің ДНҚ-сында сыналған. Әзірленген нақты уақыттағы ПТР әдісін тестілеу кезінде гетерогенді микроорганизмдер теріс нәтиже көрсетті. Нақты уақыттағы ПТР тест жүйесі арқылы *S. enterica* бактериясының ДНҚ 1-10 микробтық жасуша ішінде анықтауға мүмкіндік береді. Әзірленген нақты уақыттағы ПТР сынақ жүйесі 2018-2019 жылдары жиналған 1020 биологиялық сынаманы (883 тағам сынамасы және 137 клиникалық үлгі) зерттеу нәтижесінде *S. enterica* изоляттарының 99 (9,7%) анықтауға мүмкіндік берді. *S. enterica* бактериясын анықтауда нақты уақыттағы ПТР тест жүйесінің балау тиімділігі 100% құрады.

Түйін сөздер: нақты уақыттағы ПТР; *S. enterica*; праймер; зонд; ерекшелік; сезімталдық.

DEVELOPMENT OF A REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD FOR THE DETECTION OF S. ENTERICA

S.M. Barmak 

LLP "Kazakh research institute of processing and food industry", Almaty, Kazakhstan
sabyr95@mail.ru

Abstract. Polymerase chain reaction (PCR) has become a widely used tool for the detection, identification and differentiation of pathogenic microorganisms in the diagnosis of human and animal diseases. Frequent outbreaks of *Salmonella* associated with food require the development of rapid detection methods to control the spread of the disease. Real-time PCR (RT-PCR) can detect the presence of pathogen DNA. Detection of *Salmonella* in RT-PCR was carried out using the developed primers SInv-1F, SInv-1R and the SE-Probe probe. Positive results were obtained when testing the

specificity of the RT-PCR test system for the detection of *S. enterica* using DNA from the bacteria *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and *S. Virchow* as templates. The developed RT-PCR test system for the detection of *S. enterica* DNA was tested on the DNA of heterologous microorganisms of the genera *Pasterella*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Mycoplasma*, *Candida* and *Aspergillus*. Heterologous microorganisms showed a negative result when testing the developed RT-PCR. The RT-PCR test system allows you to detect *S. enterica* DNA within 1-10 microbial cells. The developed RT-PCR test system made it possible to identify 99 (9.7%) *S. enterica* isolates as a result of examining 1020 biological samples (883 food samples and 137 clinical samples) collected in 2018-2019. The diagnostic efficiency of the *S. enterica* RT PCR test system was 100%.

Keywords: RT PCR; *S. enterica*; primer; probe; specificity; sensitivity.