

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**РУБЛЕНКО НАТАЛІЯ МИХАЙЛІВНА**

УДК 636.09:614.4:57.083.1[57.063.8:579.842.1.2]:577.213.3(477)

**ДЕТЕКЦІЯ ФАКТОРІВ ПАТОГЕННОСТІ У БАКТЕРІЙ  
*SALMONELLA SPP.* В ПОЛІМЕРАЗНІЙ ЛАНЦЮГОВІЙ РЕАКЦІЇ**

16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,  
інфекційні хвороби та імунологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2021

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Роботу виконано в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів

**Науковий керівник** доктор ветеринарних наук,  
професор, академік НААН  
**Головко Анатолій Миколайович,**  
Державний науково-контрольний інститут  
біотехнології і штамів мікроорганізмів,  
директор

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук, професор,  
член-кореспондент НААН  
**Герілович Антон Павлович,**  
Національний науковий центр  
«Інститут експериментальної  
і клінічної ветеринарної медицини» НААН  
заступник директора з наукової роботи

доктор ветеринарних наук, професор  
**Уховський Віталій Вікторович,**  
Державний науково-дослідний інститут  
з лабораторної діагностики  
та ветеринарно-санітарної експертизи,  
старший науковий співробітник  
науково-дослідного епізоотологічного відділу

Захист відбудеться «22» квітня 2021 року о 13<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «20» березня 2021 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

В. В. Мельник

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Нині птахівництво – одна із найбільш потужних галузей аграрного виробництва (Windhorst H. W., 2017; Mottet A., 2017; Athrey G., 2020). Основним інфекційним агентом, що спричинює контамінацію продукції птахівництва, є бактерії роду *Salmonella* (OIE Terrestrial Manual, 2018). Їх джерелом здебільшого є корми та хвора птиця (Foley S. L. et al., 2013; Antunes P. et al., 2016). Сальмонельозна інфекція може перебігати як за типових клінічних симптомів, так і субклінічно (Andres S. et al., 2013; Argüello H. et al., 2018).

За моніторингу епізоотичної ситуації в птахівничих господарствах та дослідженні біологічного матеріалу птиці найчастіше виділяють серовари, що належать до виду *enterica*: Gallinarum, Pullorum, Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Virchow (EFSA, 2018).

В Україні впродовж 10 років зберігається тенденція збільшення циркуляції сероварів *S. Enteritidis* (Якубчак О. М., Кобиш А. І., 2012; Галка І. В. та ін., 2019). У 2015 р. частка цих сальмонел, виділених з патологічного матеріалу, становила 5,9 % (Гаркавенко Т. О., Яблонська О. В., 2016).

Заразом збудники пулорозу і тифу птиці досі є одними з найпоширеніших ізолятів сальмонел (Фотіна Т. І., 2016). У 2015 р. їх виділяли у 28,4 % випадків (Гаркавенко Т. О., Яблонська О. В., 2016). У Харківській області у 2010–2015 рр. 23,3 % випадків захворювань тварин і птиці становлять сальмонельоз та пулороз, серед збудників яких переважають бактерії серовару *S. Gallinarum* – 71,8 % (Ушкалов В. О., 2017).

Найбільшу частку серед виділених сероварів від людей, що споживали м'ясо та яйця птиці, від птиці та з продукції птахівництва з різних зон України становила *S. Enteritidis* – відповідно 35,1 %, 28,9 та 48,9 % (Фотіна Т. І. та ін., 2018).

В Україні з 2016 р. діє Інструкція з профілактики та ліквідації сальмонельозу птиці, узгоджена із директивами МЄБ. Відповідно до цього, постановка діагнозу здійснюється за виділення чистої живої культури бактеріологічними методами, а додатковими методами є імуноферментний та полімеразна ланцюгова реакція. Остання використовується і для вивчення властивостей штамів сальмонел. Низкою досліджень (Galan J. E., 1996; Vazeille E. et al., 2016; Jennings E. et al., 2017) виявлено окремі генетичні детермінанти транспорту бактеріальних білків, синтезу систем кислотного і теплового шоку та протидії фагоцитозу. Однак, в Україні такі дослідження поодинокі (Ареф'єв В. Л., 2018).

Отже, моніторинг, детекція та вивчення молекулярно-генетичних профілів і факторів патогенності штамів сальмонел, що виділяють на території України з патологічного і біологічного матеріалів та за контролю продукції птахівництва, є актуальними, оскільки це дасть змогу розробити новітні засоби діагностики і профілактики сальмонельозу птиці для його контролю та забезпечення громадського здоров'я.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертацію виконано згідно з науково-дослідними роботами «Удосконалення системи підтримання та розширення колекції Національного центру штамів мікроорганізмів» (номер державної реєстрації 0116U007116, 2015–2016 рр.) та «Розробка засобів та методів контролю і стандартизації ветеринарних імунобіологічних засобів (ВІЗ) та мікробіологічних досліджень» (номер державної реєстрації 0109U001083, 2017–2019 рр.), у якій здобувачем виконано розділ «Розробка системи діагностики сальмонельозу методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі».

**Мета та завдання дослідження.** Мета дисертаційного дослідження – моніторинг і детекція розповсюдженості генів факторів патогенності та резистентності до антибактеріальних препаратів, обґрунтування їх фенотипових проявів у музейних і польових штамів виду *Salmonella enterica*.

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

- провести моніторинг лабораторних досліджень в Україні щодо розповсюдження бактерій роду *Salmonella* (2006–2019 рр.);

- провести виділення чистих культур ізолятів сальмонел із господарств з вирощування бройлерів та виробництва яєць та сформуванню вибірку польових штамів;

- дослідити чутливість польових та музейних штамів сальмонели до антибактеріальних препаратів;

- встановити молекулярно-біологічні характеристики польових і музейних штамів сальмонел щодо наявності помірних бактеріофагів за індукції хіміотерапевтичним препаратом Мітоміцин С;

- дослідити наявність та поширеність генів патогенності, антибіотикорезистентності та репліконів плазмід серед польових та музейних штамів сальмонел;

- розробити на підставі встановлених молекулярно-біологічних властивостей мультиплексу систему для виявлення генетичного матеріалу сальмонел.

*Об'єкт дослідження* – сальмонельоз птиці.

*Предмет дослідження* – молекулярно-біологічні властивості польових штамів та детекція факторів патогенності у музейних і польових штамів *Salmonella enterica* та діагностика їх генетичного матеріалу в об'єктах контролю продукції птахівництва.

**Методи дослідження:** епізоотологічні (вивчення поширеності збудника сальмонельозу птиці в Україні); молекулярно-біологічні (класична полімеразна ланцюгова реакція та полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі); бактеріологічні (культуральні, визначення чутливості до антибактеріальних препаратів); серологічні (визначення серовару польових штамів в реакції аглютинації); статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Проведено моніторинг поширеності сальмонел птиці в Україні за період 2006–2019 рр. в Україні. Вперше встановлено наявність генів патогенності та антибіотикорезистентності у штамів *Salmonella enterica*, що циркулюють у популяції свійської птиці

в Україні та серед штамів, які зберігаються в колекції Національного центру штамів мікроорганізмів (НЦШМ) Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. Доведено, що у всіх досліджених штамів наявний ген *invA*, експресія якого забезпечує інвазію в епітеліальні клітини тонкого кишечника, зумовлюючи патогенність сальмонел.

Встановлено наявність генів, які є основним елементом механізму експресії факторів адгезії у сальмонел: *agfB*, *sefA*, *sopE*. Ген *agfB* (кодує субодиницю білка фімбрину, який є мономером тонких агрегативних пілей) також виявлено у всіх досліджених штамів, що підтверджує їхню здатність до адгезії, яка є основним фактором патогенності. Наявність гена *sefA*, що кодує субодиницю білка фімбрину – мономеру пілей та бере участь в утворенні біоплівки, встановлено у музейних штамів Колекції Національного центру штамів мікроорганізмів *S. Enteritidis* P1 та *S. Enteritidis* M, а також у 22 польових штамів серовару *Enteritidis*, що підтверджує його специфічність.

Здійснено ідентифікацію репліконів плазмід різних груп несумісності: *pFIA*, *pN*, *pFIIA*. Доведено, що 21 % польових штамів містить реплікони плазмід двох груп, тимчасом у решти – лише один реплікон. Наявність двох репліконів у геномі встановлено у трьох штамів з Колекції Національного центру штамів мікроорганізмів. Водночас у польових та музейних штамів виявлено гени, що забезпечують синтез факторів колонізації – *gipA*, *sodC1*, *sopE*. Підтверджено наявність гена *prt* (ендотоксин), який є специфічним для сероварів групи D1: *Enteritidis*, *Dublin*, *Gallinarum*.

Встановлено наявність хромосомних генетичних детермінант антибіотикорезистентності: ген *tetG* (резистентність до тетрацикліну), ген *sulI* (резистентність до сульфаніламідів) та консервативну ділянку інтегру, яка є місцем інтеграції генів резистентності до антибактеріальних препаратів.

За результатами молекулярно-біологічних досліджень розроблено мультиплексну систему для виявлення генетичного матеріалу *Salmonella* та диференціації сероварів *Enteritidis* і *Typhimurium* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Доведено, що аналітична чутливість праймерів для детекції роду *Salmonella* становить: для *S. Typhimurium* – 0,25 нг/зразок (*Typhimurium*) та *S. Enteritidis* – 0,27 нг/зразок (*Enteritidis*).

**Практичне значення одержаних результатів.** Встановлена поширеність генів патогенності серед польових та музейних штамів бактерій роду *Salmonella* може бути використана для удосконалення епізоотологічного моніторингу та впровадження у практику ветеринарної медицини молекулярно-генетичних методів для контролю циркуляції збудників сальмонельозу. Встановлена поширеність генів резистентності до тетрациклінів, сульфаніламідів та функціональної ділянки інтегру з хромосою локалізацією у польових та музейних штамів *S. enterica* є підставою для удосконалення системи контролю за антибіотикорезистентністю бактерій. У колекції Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів задепоновано наступні штами: *S. Typhimurium* VM1, *S. Virchow* L116, *S. Typhimurium* Pg1, *S. Typhimurium* PN, *S. Enteritidis* S1, *S. Typhimurium* L1, *S. Typhimurium* L2, *S. Enteritidis* PN,

*S. Enteritidis* 11. Розроблена мультиплексна система для виявлення генетичного матеріалу *Salmonella* та диференціації сероварів *Enteritidis* та *Typhimurium* методом полімеразної ланцюгової реакції увійшла до науково-методичних рекомендацій «Методичні рекомендації з індикації та диференціації бактерій роду *Salmonella* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції» (затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Держпродспоживслужби України; протокол № 3 від 4 жовтня 2019 р).

Матеріали дисертації використовують у навчальному процесі закладів вищої освіти Національного університету біоресурсів і природокористування України, Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, Білоцерківського національного аграрного університету, Дніпровського державного аграрно-економічного університету, Поліського національного університету, Білоцерківського національного аграрного університету, Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем самостійно виконано, проаналізовано та узагальнено весь обсяг експериментальних досліджень. За участі здобувача проведено ізолювання чистих культур польових штамів *Salmonella enterica* та досліджено чутливість польових і музейних штамів до антибактеріальних препаратів у польових та музейних штамів сальмонел у відділі бактеріологічних досліджень та контролю якості ветеринарних імунобіологічних засобів, молекулярно-біологічні дослідження та індукцію помірних бактеріофагів у відділі молекулярної біології Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертації доповідалися, обговорювалися та отримали позитивну оцінку на науковому симпозіумі в межах концепції «Єдине здоров'я» (м. Київ, 2016, 2017 рр.); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (м. Біла Церква, 2019 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових праць, з яких 6 статей у наукових фахових виданнях України, у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних, методичні рекомендації, 3 тези наукових доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Робота складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів виконання роботи, результатів експериментальних досліджень, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків та пропозицій виробництву, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації становить 201 сторінку. Робота ілюстрована 16 таблицями та 37 рисунками. Список використаних джерел налічує 416 найменувань, у тому числі 387 латиницею.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Роботу виконано впродовж 2014–2020 рр. у відділі молекулярної біології та імунохімії, а також у відділі бактеріологічних досліджень та контролю якості

ветеринарних імунобіологічних засобів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Матеріалом для дослідження були польові штами (n=57) роду *Salmonella*, що надходили із регіональних лабораторій ветеринарної медицини, а також польові штами, виділені зі змивів, взятих на території низки птахівничих господарств. Водночас досліджували штами роду *Salmonella* (n=17), що належать Національному центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Ізоляти було відібрано на території птахівничих господарств у стадах бройлерів та курей-несучок. Проби відбирали від дорослого поголів'я, мертвих ембріонів, з поверхні яєць, підстилки, кормів, пуху добового молодняка та меконію.

Роботу виконували у п'ять етапів. На *першому етапі* вивчали розповсюдження сальмонельозу птиці на території України в 2006–2019 рр. на основі результатів лабораторних досліджень Державного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. Зокрема, використовували дані щодо кількості випадків сальмонельозу в різних областях з 2006 до 2019 р. інформацію про серологічні варіанти сальмонел, виділених із продуктів та сировини тваринного походження державними лабораторіями ветеринарної медицини під час виконання Програми лабораторного контролю за сальмонельозом (Наказ № 310 від 19.09.2016 «Про затвердження Інструкції з профілактики та ліквідації сальмонельозу птиці»).

На *другому етапі* роботи було здійснено ідентифікацію генів факторів патогенності та факторів, що можуть підвищувати вірулентність у сальмонел, виділених від свійської птиці та у штамів з колекції НЦШМ Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. Ідентифікацію проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з електрофорезом в агарозному гелі. Відбирали поодинокі колонії чистих культур та виділяли ДНК за допомогою набору «ДНК-сорб» (Амплісенс, Російська Федерація).

Результати ампліфікації візуалізували за допомогою методу електрофорезу в агарозному гелі (Thermo Scientific) із концентрацією 1,5 % (1,2 % – для репліконів плазмід; 1 % – для ділянки 5'-3' CS) та зберігали електрофореграми для подальшого аналізу із використанням системи Gel Doc RX (Biorad, США).

Ідентифікацію таргетних генів і ділянок (*invA*, *agfB*, *sefA*, *pri*, *sul1*, 5'-3'CS, *tetG*) та репліконів плазмід (*pN*, *pFIA*, *pFIIA*) проводили у полімеразній ланцюговій реакції з використанням відповідних праймерів (табл. 1).

Для приготування реакційної суміші використовували реагенти Fisher Scientific: буфер 10X DreamTaq Buffer (+MgCl<sub>2</sub>, полімерази DreamTaq DNA polymerase, суміш дезоксинуклеотидів dNTP (10 mM), воду (AppliChem) та праймери (Литех, Російська Федерація).

*Третім етапом* роботи було визначення чутливості до антибактеріальних препаратів. Чисту культуру ізоляту культивували на рідкому поживному середовищі Мюллера-Хінтона (HiMedia, Індія) за температури 37 °C упродовж

18 год та висівали на агар Мюллера-Хінтона (HiMedia, Індія). Читку реакції проводили відповідно до стандарту CLSI. Як контрольний було використано штам *E. coli* ATCC25922. Визначали чутливість до ампіциліну (AMP<sup>10</sup>), цефоперазону (CPZ<sup>75</sup>), цефтазидиму (CAZ<sup>30</sup>), цефтриаксону (CTR<sup>30</sup>), тетрацикліну (T<sup>30</sup>), доксицикліну (DO<sup>30</sup>), стрептоміцину (S<sup>10</sup>), гентаміцину (GEN<sup>10</sup>), налідиксової кислоти (NA<sup>30</sup>), ципрофлоксацину (CIP<sup>5</sup>), триметоприму (TR<sup>5</sup>) та хорамфеніколу (C<sup>30</sup>). Використовували диски виробництва HiMedia (Індія).

Таблиця 1

**Олігонуклеотидні праймери, використані у дослідженні**

Ген	Послідовність олігонуклеотидних праймерів (5'→3')	Розмір фрагмента ДНК (п. н.)	Автори
<i>invA</i>	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA	285	Borges et al., 2013
<i>agfB</i>	TGATGTTGACAATACTGGGTGCG CGATATACTGGCATCGTTGGCAT	293	Власна розробка
<i>sefA</i>	GCCGTACACGAGCTTATAGA ACCTACAGGGGCACAATAAC	310	Amini et al., 2010
<i>prt</i>	ATGGGAGCGTTTGGGTTC CGCCTCTCCACTACCAACTTC	624	Hong et al., 2008
<i>pFIA</i>	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462	Mezal et al., 2014
<i>pN</i>	GTCTAACGAGCTTACCGAAG GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	559	Mezal et al., 2014
<i>pFIIA</i>	CTGTCGTAAGCTGATGGC CTCTGCCACAACTTCAGC	270	Mezal et al., 2014
<i>tetG</i>	CAGCTTTCGGATTCTTACGG GATTGGTGAGGCTCGTTAGC	844	Ahmed et al, 2007
<i>sull</i>	GTGACGGTGTTCGGCATTCT TGAGTGCATAACCACCAGCC	378	Ahmed et al., 2007
5'-3'CS	GGCATCCAAGCAGCAAGC AAGCAGACTTGACCTGAT	1009	Ahmed et al., 2007
<i>gipA</i>	ACGACTGAGCAGCGTGAGTTG GAAATGGTGACGGTAGAC	422	Osman et al., 2014
<i>sopE</i>	ACACACTTTCACCGAGGAAGCG GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG	398	Osman et al, 2014
<i>sodC1</i>	CGGGCAGTGTTGACAAAT AAAGTGTTGGAATTGTGGAGTC	424	Osman et al., 2014

На четвертому етапі досліджень проводили індукцію помірних бактеріофагів з використанням Мітоміцину С. Чисту бактеріальну культуру висівали у 100 мл стерильного рідкого поживного середовища Luria-Bertani (Lennox) та культивували впродовж 20 год за температури 37 °С.

З метою індукції помірних фагів відбирали 10 мл отриманої суспензії та додавали до неї Мітоміцин С (Sigma-Aldrich, Німеччина) до концентрації 2 мкг/мкл. Культивування продовжували за температури 37 °С 4 год. Клітини



осаджували центрифугуванням ( $g=1000$ , 10 хв), а отриманий надосад пропускали через фільтри з розміром пор 0,22 мкм.

Готували серію 10-кратних розведень фільтрату ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ). У стерильні пробірки вносили 1 мл розплавленого 0,7 % середовища Luria-Bertani (Muller), 1 мл розведеного фільтрату та 0,1 мкл досліджуваної культури. Вміст пробірки перемішували та рівномірно розподіляли в чашці Петрі з 1,5 % стерильним середовищем Luria-Bertani (Muller). Після цього культури інкубували за температури 37 °C упродовж 20 год та надалі визначали наявність зон лізису візуально. Титр фагу (БУО/мл – бляшкоутворювальні одиниці/мл) розраховували за формулою: кількість зон лізису (кількість видимих бляшок)  $\times$  10  $\times$  зворотний коефіцієнт розведення (Raya and Hebert, 2009).

П'ятим етапом роботи було розроблення наборів праймерів для ідентифікації бактерій роду *Salmonella* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. З цією метою було проаналізовано 97 повногеномних послідовностей різних сероварів сальмонел з електронних баз даних GenBank (США), EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека) та DDBJ (Японська база даних ДНК). У результаті вирівнювання нуклеотидних послідовностей та аналізу їх гомології було обрано наступні таргетні гени: *invA* – для ідентифікації роду *Salmonella*, *fliC* – для ідентифікації серовару Typhimurium, ген гіпотетичного білка, що містить домен DUF1391 – для ідентифікації серовару Enteritidis (табл. 2).

Таблиця 2

**Послідовності олігонуклеотидних праймерів та зондів,  
використаних у дослідженні**

5' – mod	Послідовність	3' – mod	
forward	GAAGCGGCTGCTACAACCAC	–	Typhimurium
reverse	GATACGGCTACGGGCAGAAG	–	
Cy5	TGCTTTGGCACAGGTTGACACGTT	BHQ3	
forward	CGTTATTGCCGAGGTGGATT	–	Enteritidis
reverse	TAAGGGGAGAGGGAAAGATGG	–	
HEX	TGAGCCAAAAACATATCCCATCCATT	BHQ2	
forward	CTGTTTACCGGCATACCATC	–	<i>Salmonella</i> genus
reverse	TCGCACTGAATATCGTACTGGC	–	
FAM	CAAAACCCACCGCCAGGCTATCG	BHQ1	

Аналітичну чутливість олігонуклеотидних праймерів визначали шляхом тестуванням серії 10-кратних розведень ДНК паралельно для *S. Typhimurium* та *S. Enteritidis*.

Для підтвердження специфічності гетерологічних зразків використано штами з колекції НЦШМ: *E. coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112. Реакцію ампліфікації проводили на приладі Bio-rad CFX (США) з використанням наступного термопрофілю: 1) 95,0 °C 5:00; 2) 95,0 °C 0:15; 3) 60,0 °C 0:50. Флуоресценцію вимірювали за барвниками Cy5 (*S. Typhimurium*), HEX (*S. Enteritidis*) та FAM (*Salmonella spp.*). Ампліфікацію

всіх зразків здійснювали у трьох повторах. Для всіх значень  $S_t$  було розраховано середнє квадратичне відхилення під час визначення збіжності.

Загальні результати досліджень викладено у вигляді таблиць, рисунків, графіків та фотографій. Статистичне оброблення результатів здійснено за допомогою програми MS Excel. Для визначення збіжності розраховували середнє квадратичне відхилення за критерієм  $SD \leq 0,5$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

У дисертації наведено результати аналізу поширеності сальмонел в Україні впродовж 2006–2019 рр. Проведено молекулярно-генетичний аналіз методом полімеразної ланцюгової реакції польових штамів *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, виділених в Україні від птиці упродовж 2014–2018 рр., та штамів *Salmonella enterica* subsp. *enterica* НЦШМ Державного науково-контрольного інституту біотехнології мікроорганізмів. Визначено чутливість польових та музейних штамів до антибактеріальних препаратів та проведено індукцію помірних бактеріофагів. Розроблено набір праймерів для ідентифікації роду *Salmonella* та сероварів Enteritidis і Typhimurium методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, на основі якого розроблено методичні рекомендації.

**Моніторинг розповсюдження сальмонел в Україні (2006–2019 рр.).** Результати досліджень продукції птахівництва та досліджень, проведених за програмою контролю сальмонельозу птиці, демонструють зменшення розповсюдження сальмонел на території України (рис. 1).

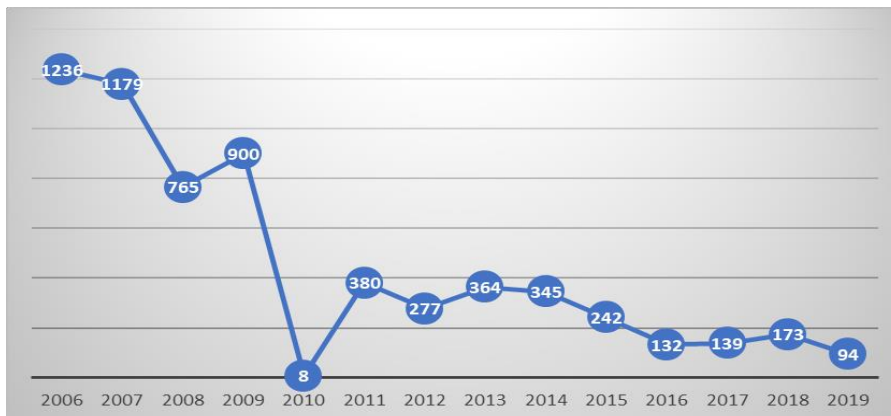


Рис. 1. Загальна кількість культур *Salmonella spp.*, виділених під час бактеріальних досліджень патологічного та біологічного матеріалу впродовж 2006–2019 рр.

Аналіз серологічної структури культур, виділених під час дослідження зразків, відібраних від хворих тварин, кормів та сировини тваринного походження, санітарно-гігієнічних дослідженнях, доводить домінування в Україні серовару Enteritidis, а також значну поширеність серовару Typhimurium (рис. 2).

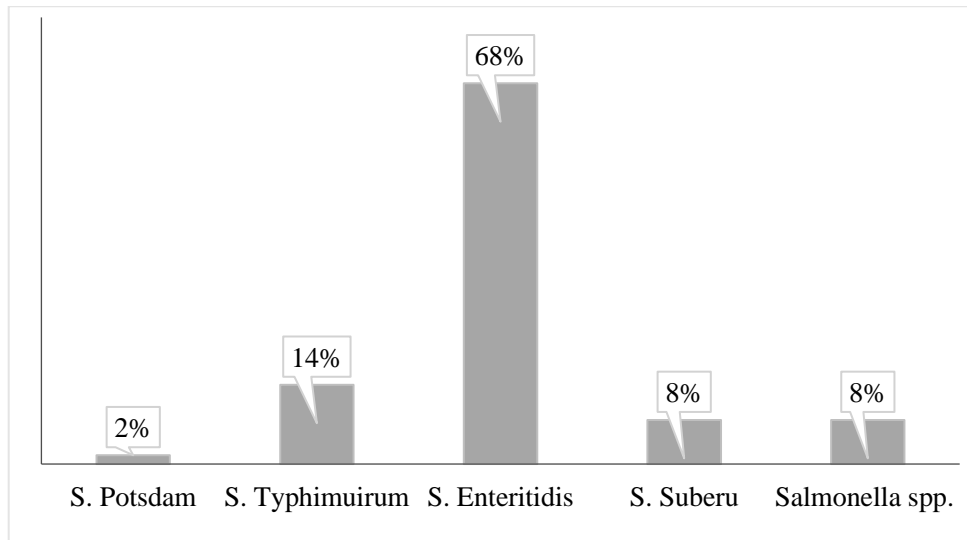


Рис. 2. Розподіл культур, виділених в Україні впродовж 2015–2019 рр.

Так, у 2016 р. серед 143 ізолятів сальмонел, виділених державними лабораторіями ветеринарної медицини України, 76,22 % становили культури, виділені зі зразків патологічного матеріалу птиці, та зі зразків, відібраних в умовах вирощування поголів'я різного промислового напрямку. Серед них 50 ізолятів належали до серовару *S. Gallinarum* та його біовару *Pullorum*. Решта були нетипованими, або ж відносилися до сероварів *Typhimurium* та *Enteritidis*.

У 2017 р. під час проведення бактеріологічних досліджень було виділено 148 культур сальмонел зі зразків патологічного та біологічного матеріалу від тварин. Серед них 121 зразок (81,75 % від загальної кількості) – від птиці. За проведення досліджень відповідно до Програми державного ветеринарно-санітарного контролю сальмонельозу птиці було виділено 19 культур з чотирьох господарств за напрямками вирощування племінної птиці, курей-несучок, бройлерів та виробництва яєць і яєчних продуктів. У серологічній структурі переважали культури сероварів *Gallinarum* (27,5 % від загальної кількості всіх виділених культур в 2017 р.), *Enteritidis* (19,7 %) та *Typhimurium* (15,5 %).

У 2018 р. за проведення бактеріологічних досліджень зразків патологічного та біологічного матеріалу від тварин було виділено 116 культур сальмонел, з них 92 (79,3 %) – від птиці. Окрім того, за Програмою державного ветеринарно-санітарного контролю сальмонельозу птиці було виділено 119 зразків у господарствах з вирощування племінної водоплавної птиці, племінних курей, інкубаційних станцій водоплавної птиці, інкубаційних станцій курей, яєць і яєчних продуктів курей і качок, стад бройлерів та продуктів забою курей та індиків. У лабораторіях ветеринарної медицини проводили дослідження сировини тваринного походження, харчових продуктів та кормів, за результатами яких виділили 121 культуру сальмонел, із них 20,7 % належали до серовару *Enteritidis*. Серед 121 культури сальмонел – 78 виділено від м'яса та субпродуктів птиці, фаршу із м'яса птиці механічного обвалення та яєць.

У 2019 р. 40 культур сальмонел було виділено зі зразків біологічного та патологічного матеріалу тварин та птиці, з них 36 – від птиці. Серед цих культур 21 належала до серовару Gallinarum, 6 – Typhimurium.

Під час дослідження сировини тваринного походження, кормів та харчових продуктів було виділено 73 культури сальмонел. Із них 18 (24,6 % від загальної кількості) належали до серовару Enteritidis, 16 (21,9 %) – до групи D, 15 культур (20,5 %) – до групи C. Зі зразків м'яса та субпродуктів птиці, яєць, фаршу із м'яса птиці механічного обвалення було виділено 24 культури *Salmonella*, що становило 32,9 % від загальної кількості 73 зразків.

Отже, частота випадків виділення сальмонел різних сероварів в Україні зменшується. Водночас у структурі збудника найбільш поширеними є серовари Enteritidis, Typhimurium, які становлять загрозу для громадського здоров'я, оскільки є убіквітарними. Контамінація продукції тваринництва цими сероварами створює загрозу ситуацію для безпечності харчової продукції тваринницької галузі, зокрема птахівництва, що потребує постійного контролю для виявлення способів занесення інфекції в господарства.

З огляду на зазначені вище умови, необхідними є дослідження біологічних властивостей сальмонел, що циркулюють на території України, дослідження їх молекулярно-генетичних основ патогенності. Зокрема, дослідження на наявність генетичних детермінант, що підвищують патогенність та їх комбінації у різних популяцій. Методи діагностики, створені на їх основі, можуть підвищити ефективність виявлення та ідентифікації високопатогенних сальмонел, що дасть змогу покращити контроль та попередити спалахи захворювання.

**Виділення ізолятів виду *Salmonella enterica* та визначення серотипу в реакції аглютинації за схемою Вайта-Кауфмана.** Виділення чистих культур сальмонели проводили згідно з ISO 5679 1:2017. Змиви відбирали за допомогою стерильних ватних тампонів та поміщали на транспортне середовище Стюарта (Deltalab, Іспанія) згідно з вимогами до відбору зразків, викладеними в чинній Інструкції з профілактики та ліквідації сальмонельозу птиці (затверджено Наказом Міністерства аграрної політики та продовольства України № 310 від 19.09.2016).

Для виділення живої культури сальмонели під час дослідження було використано 675 змивів. Із них 128 було отримано з господарства із виробництва яєць у Київській області, решту – 547 змивів – було відібрано у трьох господарствах з вирощування стад бройлерів Київської та Черкаської областей. Проби відбирали від дорослого поголів'я, загиблих ембріонів, з поверхні яєць, підстилки, кормів, пуху добового молодняку та меконію.

За результатами бактеріологічних досліджень з'ясовано, що основна маса польових штамів була виділена від мертвих ембріонів, підстилки, яєць та кормів. Усього було виділено 12 польових штамів: 4 належали до серовару Typhimurium, 3 – Enteritidis, 1 – Gallinarum, 1 – Virchow. Також серед 14 польових штамів 3 не було віднесено до жодного серовару.

До вибірки 57 польових штамів входили ізоляти, виділені на даному етапі та ізоляти, що надходили з регіональних лабораторій ветеринарної медицини.

До вибірки ввійшли 22 (38,6 %) ізоляти серовару Enteritidis, 14 (24,6 %) ізолятів Typhimurium, 6 (10,53 %) – Gallinarum Pullorum. Останні не диференціювали за біоваром, а вважали одним сероваром. Також було відібрано 4 (7 %) ізоляти Infantis, 3 (5,3 %) ізоляти Virchow, 2 (3,5 %) ізоляти Heidelberg, 1 (1,8 %) ізолят Nadar, 1 (1,8 %) ізолят Kentucky та 4 (7 %) нетипованих ізоляти виду *Salmonella enterica* (рис. 3).

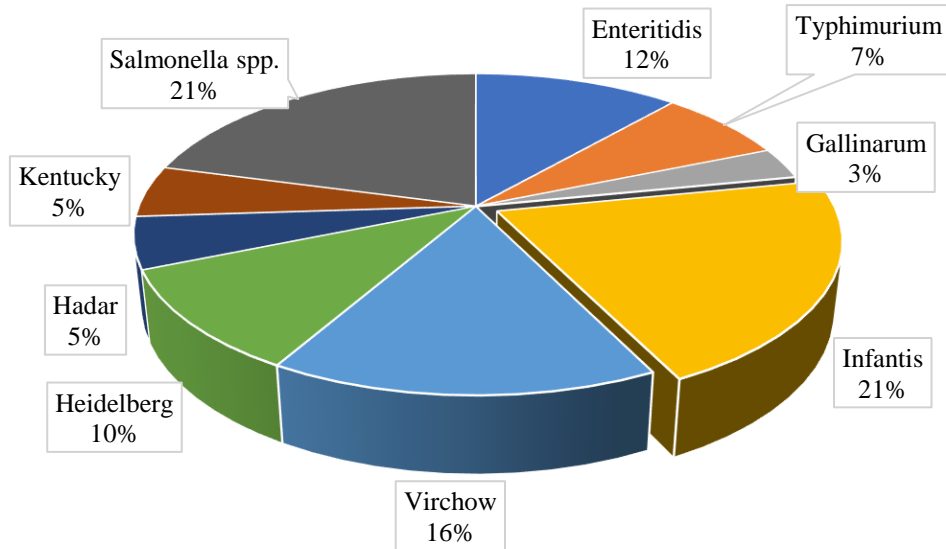


Рис. 3. Розподіл групи польових штамів (n=57) за сероварами

**Детекція генів, що кодують фактори патогенності та компонента бактеріальної клітинної стінки.** Здійснено ідентифікацію генів факторів патогенності та факторів, що можуть підвищувати вірулентність у сальмонел, виділених від свійської птиці та у штамів з колекції НЦШМ. Підтверджено наявність генів *invA* (інвазія) та *agfB* (адгезія) у 100 % досліджених штамів. Ген *invA* є спільним для всього роду *Salmonella*, тобто було підтверджено їх здатність до інвазії епітеліальних клітин тонкого кишечника.

Оскільки ген *invA* є головним у механізмі формування специфічних фагосом, які утворюються збудником у цитоплазмі еукаріотичної клітини, що дає змогу уникнути фагоцитозу та продовжувати персистенцію в організмі тварини. Водночас ген *agfB* є частиною оперону *agfABC*, який кодує механізм формування тонких агрегативних фімбрій та бере участь у формуванні білкового комплексу SEF17 (White N. J. et al., 2001; Quan G. et al., 2019).

Наявність гена *sefA* виключно в штамів *S. Enteritidis* підтверджує дані про його специфічність для цього серовару та можливість використовувати як мішень для ідентифікації *Salmonella Enteritidis* у полімеразній ланцюговій реакції. Ген *sefA* належить до кластера *sefABCD*, який кодує білок фімбрії SEF14 (Rajashekar G. et al., 2000; Wray C., 2000; Shome A. et al., 2020). *SefA* кодує велику субодиницю білку, тимчасом *sefB* – білок-шаперон (Shome A. et al., 2020). Ген *sefA* було виявлено (рис. 4) у 11,8 % штамів НЦШМ (2 з 17) – *S. Enteritidis* P1 та *S. Enteritidis* M. Серед ізолятів було ідентифіковано значно більше – 39 % (22 із 57 ізолятів).

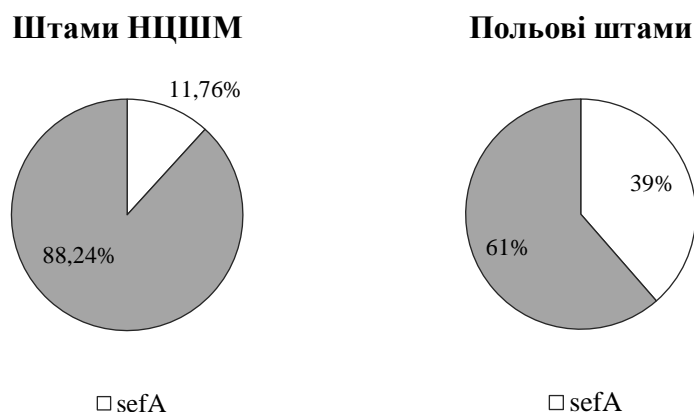


Рис. 4. Наявність гена *sefA* у штаммах Національного центру штамів мікроорганізмів та у польових штаммах (НЦШМ)

Ген *prt* було виявлено (рис. 5) у штаммах сероварів Enteritidis, Gallinarum, а також у штамів сероварів Enteritidis, Dublin, Gallinarum, що кодує фермент паратозосинтазу, який регулює синтез клітинної стінки бактерії.

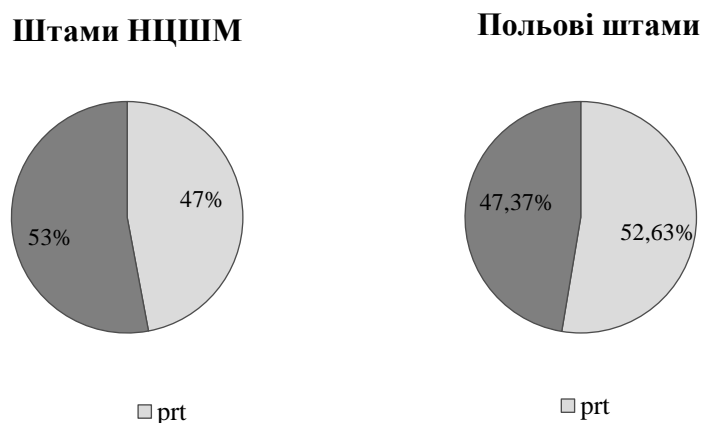


Рис. 5. Наявність гена *prt* у штаммах Національного центру штамів мікроорганізмів та у польових штаммах (НЦШМ) та у польових штаммах

У науковій літературі описано значну кількість варіантів одночасної ампліфікації гена *prt* з іншими специфічними генами для ідентифікації різних сероварів групи D, оскільки *prt* є специфічним для неї (Raharjo D. et al., 2019). У цьому випадку підтверджено наявність гена *prt* (рис. 6), а отже – наявність механізму для формування O-антигена (Herrera-León S. et al., 2007).

Отже, у польових та музейних штамів наявні, однак, не в однаковій кількості, гени, експресія яких забезпечує інвазію та адгезію у всіх сероварів *Salmonella*.

**Детекція генів помірних бактеріофагів: *gipA*, *sopE*, *sodCI*.** Ген *gipA* було виявлено у чотирьох штаммах *S. enterica* з колекції НЦШМ та у польових штаммах: *S. Abortusovis* 372, *S. Pullorum* K, *S. Choleraesuis* 370 та *S. Dublin* 373. Окрім того, ген *gipA* виявлено у таких польових штамів: Enteritidis 6L, Typhimurium PN061. У результаті електрофорезу в агарозному гелі було отримано фрагменти дволанцюгової ДНК розміром 422 п. н. (рис. 7).

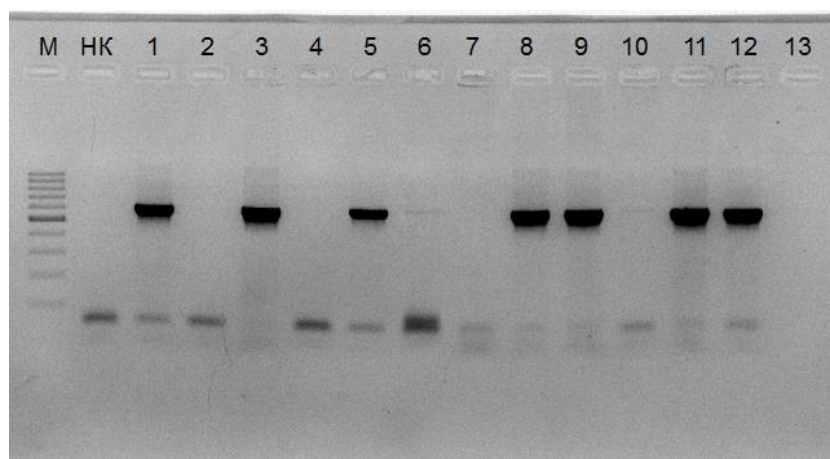


Рис. 6. Електрофореграма продуктів полімеразної ланцюгової реакції на наявність гена *prt*: М – маркер 100 bp Plus O'Gene Ruler; НК – негативний контроль; 1 – *S. Pullorum* К; 2 – *S. Typhimurium* 371; 3 – *S. Enteritidis* М; 4 – *S. Typhimurium* 3; 5 – *S. Enteritidis* P1; 6 – *S. Adabraka* 1; 7 – *S. Abortusovis* 372; 8 – *S. Pullorum* Ставропольський; 9 – *S. Pullorum* Петелінський; 10 – *S. Typhimurium* 144; 11 – *S. Pullorum* 941; 12 – *S. Dublin* К

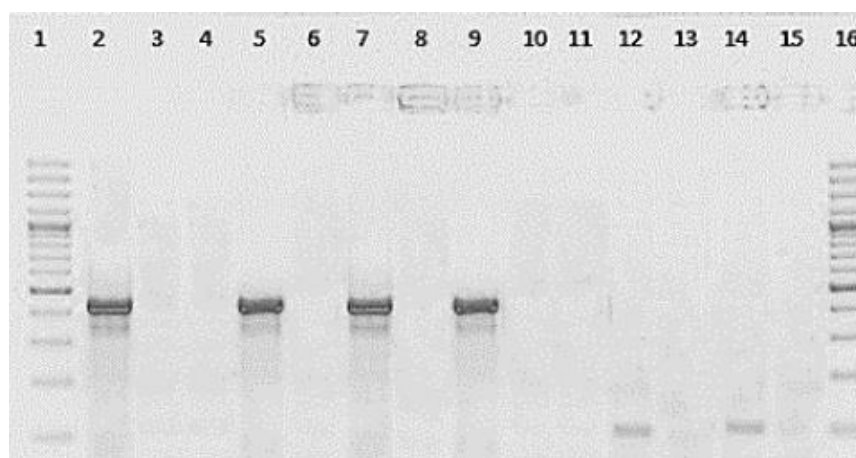


Рис. 7. Електрофореграма продуктів полімеразної ланцюгової реакції на наявність гена *gipA*: 1, 16 – Маркер; 2 – *S. Abortusovis* 372; 3 – *S. Typhimurium* 144; 4 – *S. Typhimurium* В; 5 – *S. Pullorum* К; 6 – *S. Typhimurium*; 7 – *S. Choleraesuis* 370; 8 – *S. Adabraka* 1; 9 – *S. Dublin* 373; 10 – *S. Typhimurium* 371; 11 – *S. Enteritidis* P1; 12 – *S. Enteritidis* М; 13 – *S. Gallinarum* Pullorum Ставропольський; 14 – *S. Gallinarum* Pullorum Петелінський; 15 – *S. Gallinarum* Pullorum 941

Ген *sopE* було виявлено у 5 штаммах: *S. Pullorum* К, *S. Pullorum* Ставропольський, *S. Pullorum* Петелінський, *S. Pullorum* 941, *S. Dublin* 373. Після отримання ампліконів у полімеразній ланцюговій реакції було проведено електрофорез в агарозному гелі з концентрацією 1,5 %. У лунках із зазначеними вище штаммами було зафіксовано фрагмент дволанцюгової ДНК розміром 398 п. н. У решти штамів ген не виявлено, про що свідчить відсутність фрагмента у відповідних лунках агарозного гелю. Неспецифічних продуктів реакції також не було виявлено. Як негативний контроль було взято зразок,

у який замість матриці ДНК додавали стерильну дейонізовану воду, очищену від ДНКз/РНКз.

Встановлено наявність гена *sodC1* у наступних штаммах: *S. Pullorum* К, *S. Pullorum* Ставропольський, *S. Pullorum* Петелінський, *S. Pullorum* 941, *S. Dublin* 373. На електрофореграмі було виявлено фрагменти дволанцюгової ДНК розміром 424 п. н.

Встановлено, що серед трьох генів помірних фагів, які кодують фактори інвазії та колонізації, у польових штамів найменше зустрічався ген *gipA* – у 13,63 % польових штамів *Enteritidis* (3 з 22), та у 14,28 % польових штамів *Typhimurium* (2 з 14). Серед нетипованих польових штамів, а також тих, що належать до сероварів *Gallinarum*, *Infantis*, *Virchow*, *Nadar* та *Heidelberg*, ген *gipA* не виявляли.

Значно більше поширення серед польових штамів мали гени *sopE* та *sodC1* – 77,19 та 56,14 % відповідно. Ген *sopE* було виявлено у 14 (24,6 % від загальної кількості польових штамів) польових штамів *Enteritidis*, 11 (19,3 %) польових штамів *Typhimurium* та у 14 (24,6 %) польових штамів інших сероварів: 4 (7 %) польові штами *Gallinarum*, 4 (7 %) нетиповані, 3 (5,3 %) *Virchow*, 2 (3,5 %) *Infantis*, 1 (1,8 %) *Nadar*. Наявність гена *sodC1* встановлено у 16 (28 %) польових штамів *Enteritidis*, 6 (10,5 %) – *Typhimurium* та у 10 (17,5 %) польових штамів інших сероварів: 3 (5,3 %) польові штами *Infantis*, 3 (5,3 %) нетиповані, 2 (3,5 %) *Gallinarum*, 1 (1,8 %) *Virchow* та 1 (1,8 %) *Nadar*.

Отже, у польових та музейних штамів ідентифіковано гени, експресія яких забезпечує колонізацію, що створює умови для подальшої персистенції збудника в інфікованому організмі та поширення його у навколишнє середовище. Окрім того, ці гени підвищують патогенність бактерій, тому штами, у яких вони виявлені, є потенційно високопатогенними.

**Детекція репліконів плазмід.** За результатами досліджень реплікони *pFIA* виявляли у 8 (14 %) польових штамів: *Enteritidis* S1, *Enteritidis* 71, *Enteritidis* 8, *Typhimurium* Pg1, *Infantis* 1, та у трьох нетипованих польових штамів *Salmonella enterica*.

Серед штамів з колекції НЦШМ та у польових штаммах реплікон *pFIA* було виявлено у трьох із 17 (5,3 %): *S. Gallinarum Pullorum* Ставропольський, *S. Gallinarum Pullorum* Петелінський, *S. Gallinarum Pullorum* 941. У лунках з позитивним результатом було виявлено фрагмент дволанцюгової ДНК розміром 462 п. н. Лунки з негативним результатом, а також лунка негативного контролю не містили фрагмента 462 п.н. та неспецифічних фрагментів. У групі польових штамів реплікон *pFIIA* виявили у 6 (11,1 %) культур: 3 *Enteritidis*, 1 *Infantis* та у 2 нетипованих.

Реплікон *pN* не було виявлено у жодного штаму з колекції НЦШМ. Серед польових штамів виявили 35 позитивних: 15 польових штамів *Enteritidis* (15 з 22, 68,18 %), 7 *Typhimurium* (7 з 14, 50 %), 3 *Virchow* (3 з 3, 100 %), 6 *Gallinarum* (6 з 6, 100 %), 1 *Nadar* (1 з 1, 100 %), 2 *Heidelberg* (2 з 2, 100%) та 1 нетипований польовий штам *Salmonella enterica* (1 з 4, 25 %).



Реплікони *pFIIA* виявлено у 13 (76,5 %) штамів з колекції НЦШМ: *S. Abortusovis* 372, *S. Typhimurium* В, *S. Enteritidis* М, *S. Gallinarum Pullorum* К, *S. Gallinarum Pullorum* Ставропольський, *S. Gallinarum Pullorum* Петелінський, *S. Gallinarum Pullorum* 941, *S. Choleraesuis* ТС-177, *S. Dublin* 373. Серед польових штамів *S. enterica* реплікон *pFIIA* було виявлено у 23 із 57 (40,35 %): 12 *Enteritidis*, 6 *Typhimurium*, 4 *Infantis* та 1 нетипований польовий штам *Salmonella enterica*.

Отже, детекція реплікону плазмиди підтверджує наявність останньої. Водночас доведено одночасну локалізацію двох типів плазмід у трьох (17,6 %) музейних штамів та у п'яти польових штамів (9,3 %).

**Детекція генів резистентності до тетрацикліну, сульфаніламідів. Детекція консервативної послідовності інтегру.** Ген *tetG* було виявлено в одного штаму з колекції НЦШМ – *S. Choleraesuis* 370. Решта 16 штамів з колекції були негативними щодо наявності гена *tetG*. У 19 з 57 (33,33 %) досліджених польових штамів *Salmonella enterica* було виявлено ген *tetG*: 8 штамів *Enteritidis*, 3 *Typhimurium*, 3 *Virchow*, 3 *Gallinarum* та 2 нетипованих польових штамів *Salmonella enterica*. Наявність у лунці агарозного гелю фрагмента дволанцюгової ДНК розміром 844 п. н. свідчила про позитивний результат.

Ген *sulI* виявлено у чотирьох (23,5 %) польових штамів: *S. Enteritidis* PN, *S. Enteritidis* 11, *S. Virchow* L116, нетипований польовий штам *Salmonella enterica* (рис. 8). Ген *sulI* не було виявлено у жодного польового штаму. Позитивним результатом вважали наявність фрагменту ДНК розміром 378 п. н. на електрофореграмі у відповідній лунці агарозного гелю.

Консервативну послідовність інтегру виявляли в полімеразній ланцюговій реакції з праймерами, що фланкують фрагмент ДНК розміром 1009 п. н. Наявність інтегру було встановлено у наступних штамів з колекції НЦШМ: *S. Abortusovis* 372, *S. Typhimurium* 144, *S. Typhimurium* 371, *S. Typhimurium* В, *S. Enteritidis* М, *S. Gallinarum Pullorum* К, *S. Gallinarum Pullorum* Ставропольський, *S. Gallinarum Pullorum* Петелінський, *S. Dublin* К.

У 13 (22,8 %) польових штамів серовару *Enteritidis* було встановлено наявність консервативної послідовності інтегру. Встановлено також, що ця послідовність наявна у трьох польових штамів серовару *Typhimurium*, 3 *Infantis*, 2 *Virchow*, 1 *Gallinarum*, 1 *Nadar*, 2 *Heidelberg*, а також у 2 нетипованих польових штамів *Salmonella enterica*. Позитивні результати генів резистентності до тетрацикліну та сульфаніламідів свідчать про наявність геномного острова SGI1 (*Salmonella Genomic Island*) у культурах, ДНК яких було позитивним щодо цих генів. SGI1 – ділянка з хромосомною локалізацією, а отже, сальмонели, у яких виявлено гени *tetG*, *sulI* мають гени резистентності на хромосомах.

Встановлено наявність хромосомних генетичних детермінант антибіотикорезистентності: ген *tetG* (резистентність до тетрацикліну) виявлено в одного штаму з колекції НЦШМ – *Choleraesuis* 370 та у 19 (33,3 % від загальної кількості (n=57) польових штамів, ген *sulI* (резистентність до сульфаніламідів) не було виявлено у штамів з колекції НЦШМ, однак, виявлено

у чотирьох польових штамів (рис. 8). Консервативну ділянку інтегрону, яка є місцем інтеграції генів резистентності до антибактеріальних препаратів виявлено у 9 штамів з колекції НЦШМ (52,9 % від загальної кількості n=17) та у 27 польових штамів (47,4 %).

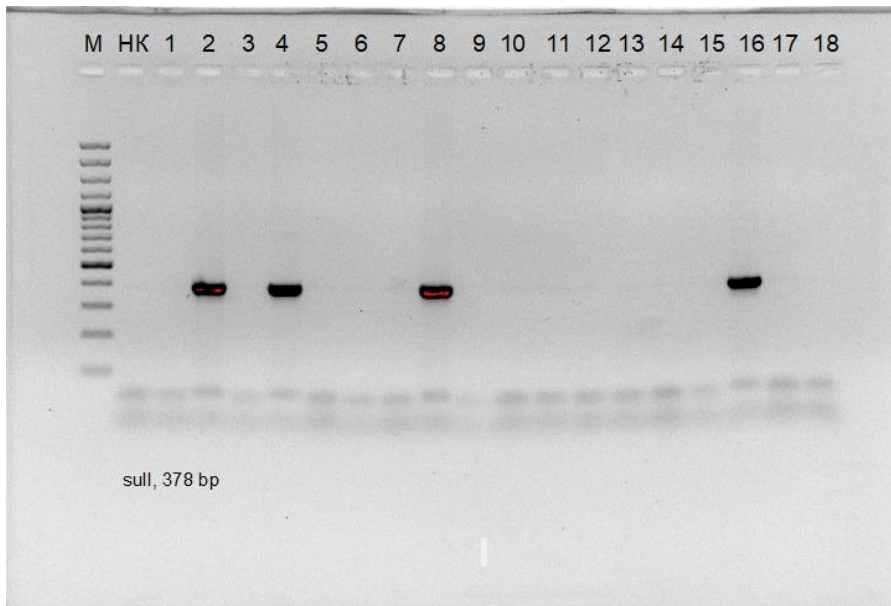


Рис. 8. Результати детекції гена резистентності до сульфаніламідів (*sulI*) у польових штамів *Salmonella enterica*: М – маркер; НК – негативний контроль; 1 – *S. Enteritidis* DN1; 2 – *S. Enteritidis* PN; 3 – *S. Enteritidis* GT; 4 – *S. Enteritidis* 11; 5 – *S. Enteritidis* N6; 6 – *S. Enteritidis* 9; 7 – *S. Enteritidis* G22; 8 – *S. Virchow* L116; 9 – *S. Enteritidis* 10; 10 – *S. Enteritidis* K13; 11 – *S. Enteritidis* P81; 12 – *S. Enteritidis* S0822; 13 – *S. Enteritidis* L2; 14 – *S. Enteritidis* S1; 15 – *S. Enteritidis* S1; 16 – *Salmonella spp* 2; 17 – *S. Enteritidis* PgA2; 18 – *S. Enteritidis* 6PR.

#### **Визначення чутливості до антибактеріальних препаратів.**

Встановлено, що у групі штамів з колекції НЦШМ чутливими до ампіциліну були 13 штамів із 17 (76,47 %). Жоден штам не проявляв резистентність, однак, у чотирьох штамів діаметр зони затримки росту становив 14–15 см, що відповідає помірній чутливості. У групі польових штамів 22 були чутливими до ампіциліну, що становить 38,59 % від загальної кількості штамів цієї групи. Резистентність до ампіциліну встановлено у 29 (50,87 %) польових штамів, помірну чутливість – у 6 (10,52 %).

Значно більшу резистентність було виявлено щодо класу цефалоспоринів: 40 (70,2 %) польових штамів були резистентними до цефоперазону, 36 – до цефтриаксону, 37 – до цефтазидиму. Чутливість до цефоперазону спостерігали у 14 (24,6 %) польових штамів. Чутливість до цефтриаксону та цефтазидиму проявляли 18 та 10 польових штамів відповідно. У групі штамів з Колекції НЦШМ 13 (74,5 %) були чутливими до цефоперазону, 4 (23,5 %) – помірно чутливими. До цефтриаксону чутливість виявлено у 15 (88,2 %) штамів, до цефтазидиму – у 16 (94,1 %). Помірно чутливими до цефтриаксону були 2 штами, до цефтазидиму – 1 штам. Серед музейних штамів не було виявлено

жодного штаму, який був резистентним до даних антибактеріальних препаратів.

Встановлено високу резистентність до препаратів класу хінолонів у групі польових штамів: 71,93 % резистентних штамів до налідиксової кислоти та 80,70 % – до ципрофлокрасину. Найнижчу резистентність було встановлено до триметоприму – 28,07 % та стрептоміцину – 33,33 %. У групі штамів з колекції НЦШМ було встановлено високу чутливість до всіх антибактеріальних препаратів.

Чутливість до тетрацикліну спостерігали у 19 (33,3 %) польових штамів, до доксицикліну – у 22 (38,6 %). Значно більшою була кількість резистентних польових штамів: 35 проявляли резистентність до тетрацикліну, 23 – до доксицикліну. Помірно чутливими до тетрацикліну були три польові штами. До доксицикліну помірну чутливість встановлено у 12 польових штамів. У групі штамів НЦШМ чутливість до тетрацикліну встановлено у 13 штамів, помірну чутливість – у 3, резистентність – в одного штаму. Чутливість до тетрацикліну встановлено у 12 штамів, помірну чутливість – у 5 штамів. Жоден штаму з колекції НЦШМ не виявляв резистентність до доксицикліну.

У результаті визначення чутливості польових штамів та штамів НЦШМ до препаратів класу аміноглікозидів було встановлено чутливість до стрептоміцину у 14 штамів з колекції НЦШМ, та у 33 польових штамів. Резистентними до стрептоміцину були 19 польових штамів. Помірну чутливість спостерігали у 5 польових штамів. Два штами з колекції НЦШМ – резистентні до стрептоміцину, один штаму – помірно чутливий. У групі польових штамів 22 були чутливими до гентаміцину, один – помірно чутливий. Резистентність до гентаміцину встановлено у 34 польових штамів. Серед штамів НЦШМ чутливість до гентаміцину встановлено у 9 штамів, помірну чутливість – у 3 штамів, резистентність – у 5 штамів.

За результатами досліджень було встановлено, що серед польових штамів 21 – чутливий до триметоприму. Помірно чутливими були 16 польових штамів, 20 – резистентними. У групі штамів НЦШМ 14 були чутливими до триметоприму. Два штами були помірно чутливими. Встановлено резистентність до триметоприму в одного штаму.

Встановлено, що 16 штамів НЦШМ є чутливими до налідиксової кислоти, до ципрофлоксацину – 14 штамів. Не виявлено жодного штаму, який проявляв резистентність до ципрофлоксацину або налідиксової кислоти. Один штаму проявляв помірну чутливість до налідиксової кислоти. Два штами були помірно чутливими до ципрофлоксацину.

У групі польових штамів 7 – чутливі до налідиксової кислоти, 10 – помірно чутливі. Було встановлено, що 40 польових штамів – резистентні до налідиксової кислоти. Не було виявлено жодного штаму, чутливого до ципрофлоксацину. Резистентність до цього препарату було виявлено у 46 польових штамів. Помірно чутливими до ципрофлоксацину були 11 штамів.

Дослідження чутливості до хлорамфеніколу встановило, що 11 штамів НЦШМ були чутливими до даного препарату. Два штами виявляли помірну

чутливість. Резистентність до хлорамфеніколу встановлено у трьох штамів. Резистентність також встановлено у 23 польових штамів. Помірно чутливими до хлорамфеніколу були 14 штамів. Чутливість встановлено у 20 польових штамів.

За результатами проведених досліджень встановлено, що польові штами мають значно вищу резистентність до всіх досліджених антибактеріальних препаратів, ніж музейні штами.

**Індукція помірних фагів з використанням Мітоміцину С.** Оцінювання присутності помірних фагів проводили за наявності зон лізису. Результати досліджень визначали за титром індукованих бактеріофагів, що фенотипові проявлялись зоною лізису на поверхні твердого поживного середовища. У групі штамів з колекції НЦШМ найвищий титр становив  $4 \times 10^4$  (*S. Typhimurium* 371), найнижчий –  $1 \times 10^4$  (*S. Enteritidis* P1). У п'яти штамів (*Typhimurium* 141, *Enteritidis* M, *Gallinarum Pullorum* Ставропольський, *Choleraesuis* TC-177, *Dublin* K) зон лізису не було виявлено. Серед польових штамів *S. Typhimurium* зон лізису не було виявлено лише у чотирьох: *S. Typhimurium* 000173, *S. Typhimurium* 16, *S. Typhimurium* VM4, *S. Typhimurium* M1003. Не спостерігали зон лізису також у наступних польових штамів: *S. Enteritidis* 4L, *S. Enteritidis* 9, *S. Enteritidis* 10M, *S. Enteritidis* GT, *S. Infantis* PN, *S. Gallinarum* 15, *S. Gallinarum* 0312, *S. Gallinarum* N18, *S. Heidelberg* 1, *S. Kentucky*.

**Розроблення системи діагностики сальмонельозу методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.** З цією метою було проаналізовано 97 повногеномних послідовностей різних сероварів сальмонел з електронних баз даних GenBank (США), EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека) та DDBJ (Японська база даних). У результаті вирівнювання нуклеотидних послідовностей і аналізу їх гомології було обрано наступні таргетні гени: *invA* – для ідентифікації роду *Salmonella*, *fliC* – для ідентифікації серовару *Typhimurium*, ген гіпотетичного білка, що містить домен DUF1391 – для ідентифікації серовару *Enteritidis*.

Аналітичну чутливість олігонуклеотидних праймерів визначали методом тестування серії 10-кратних розведень ДНК паралельно для *S. Typhimurium* та *S. Enteritidis*. З цією метою спектрофотометрично було визначено початкову концентрацію ДНК в зразку, яка становила 20,5 нг (*Typhimurium*) та 27,0 нг (*Enteritidis*). Отримані результати свідчать, що аналітична чутливість праймерів до ДНК бактерій роду *Salmonella* становить: для *S. Typhimurium* – 0,25 нг/зразок; для *S. Enteritidis* – 0,27 нг/зразок.

З метою оцінювання специфічності праймерів, що диференціюють серотипи *S. Enteritidis* і *S. Typhimurium*, було використано 57 польових штамів та 17 штамів з колекції НЦШМ виду *Salmonella enterica*. Як гетерологічні зразки для оцінювання специфічності було використано штами НЦШМ: *E. coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112.

Встановлено, що специфічність цього набору праймерів становить 100 %. Окрім того, ці праймери можуть бути використані в мультиплексному варіанті, що дає змогу одночасно проводити ідентифікацію роду *Salmonella*, а також сероварів *Enteritidis* та *Typhimurium*.

## ВИСНОВКИ

У дисертації теоретично і експериментально обґрунтовано нове вирішення проблеми сальмонельозу птахів на підставі ретроспективного моніторингу його поширеності в Україні, вивчення у порівняльному аспекті молекулярно-біологічних властивостей польових і музейних штамів за культуральними характеристиками, спектром чутливості до антибактеріальних засобів, генетичними факторами інвазії, адгезії, ендотоксинформування, хромосомної і плазмідної антибіотикорезистентності, за наявності бактеріофаг-залежної мінливості, що доводить високий рівень гено- і фенотипової мінливості циркулюючих штамів сальмонел і необхідність постійного контролю генотипів, на основі чого розроблено мультиплексну систему.

1. В Україні впродовж 2006–2019 рр. відбулося поступове зниження частоти виявлення сальмонел серед свійських тварин, зокрема птиці. Водночас серологічна структура виділених культур представлена переважно сероварами Gallinarum/Pullorum – збудниками пулорозу і тифу, та частково адаптованими сероварами Enteritidis та Typhimurium. Основну масу сероварів Enteritidis, Typhimurium, а також інших нетифоїдних сероварів – переважно групи С і В – виділяють під час лабораторних досліджень кормів, сировини тваринного походження та харчових продуктів птахівництва.

2. Сальмонели, виділені від птиці, мають найвищу резистентність до антибактеріальних препаратів класу хінолонів: налідиксової кислоти та ципрофлоксацину, що відображає світову тенденцію зростання резистентності до хінолонів та цефалоспоринів третього покоління: цефоперазону та цефтриаксону. Серед штамів НЦШМ не виявлено жодного резистентного штаму до хінолонів, тим часом серед польових штамів 70 % були резистентними до налідиксової кислоти, а 80 % – до ципрофлоксацину.

3. У результаті індукції помірних бактеріофагів Мітоміцином С у 12 штамів з 17 (70,5 %) титр фагів становив від  $1 \times 10^4$  до  $2 \times 10^7$ . Серед польових штамів зони лізису встановлено у 38 з 57 (66 %) в титрах від  $2 \times 10^3$  до  $4 \times 10^7$ . У штаму *S. Gallinarum Pullorum* Ставропольський результат індукції був негативним (відсутні зони лізису на газоні добової культури на твердому поживному середовищі), однак, попередньо в полімеразній ланцюговій реакції було ідентифіковано гени *sopE* та *sodC1*.

4. У 6 польових штамів *S. Enteritidis* був відсутнім лізис за наявності генів *gipA* (*S. Enteritidis* 15), *sodC1* (*S. Enteritidis* L2) та комбінації генів *sopE*, *sodC1* (*S. Enteritidis* GT, *S. Enteritidis* K13, *S. Enteritidis* 4v та *S. Enteritidis* T16), що свідчить про те, що ці гени локалізуються в геномі як гени факторів колонізації окремо від геному бактеріофагів, та були отримані сальмонелою в результаті горизонтального перенесення генів.

5. У трьох польових штамів *S. Typhimurium*, що мають гени помірних бактеріофагів, результат індукції був негативним, зокрема у польового штаму *S. Typhimurium* 000173 (*sopE*, *sodC1*, *gipA*), *S. Typhimurium* 16 (*sopE*, *sodC1*) та *S. Typhimurium* M1003 (*sopE*). Негативний результат індукції за наявності

генів помірних фагів також спостерігали у польових штамів *S. Gallinarum* 25 (*sopE*), *S. Nadar* (*sopE*, *sodC1*), *S. enterica* spp. 3 (*sopE*).

6. Найбільш розповсюдженим геном, який кодує фактори патогенності, є ген *invA*, що підтверджується його наявністю у польових та музейних штамів. У всіх досліджених польових штамів встановлено наявність гену *agfB*, який кодує агрегативні фімбрії. Це свідчить про здатність досліджених сальмонел до адгезії та інвазії.

7. Наявність гена *sefA*, який кодує фімбрії типу SEF14, встановлено у 22 польових штамів серовару Enteritidis та у двох штамів: *S. Enteritidis* P1, *S. Enteritidis* M. Цей тип фімбрій є специфічним для серовару Enteritidis та забезпечує бактерії адгезію до ентероцитів на початкових етапах інфекційного процесу. У решти польових штамів та штамів ген *sefA* не виявлено.

8. Ген *prt*, який кодує ліпополісахарид клітинної стінки у сероварів групи D1, виявлено у 8 штамів НЦШМ: *S. Enteritidis* M, *S. Enteritidis* P1, *S. Gallinarum* Pullorum K, *S. Gallinarum* Pullorum Ставропольський, *S. Gallinarum* Pullorum Петелінський, *S. Gallinarum* Pullorum 941, *S. Dublin* 373, *S. Dublin* K.

9. Проведена ідентифікація репліконів плазмід *pFIA*, *pN* та *pFIIA* свідчить про наявність у геномі досліджених сальмонел плазмід різних груп несумісності та дає змогу здійснити подальше типування для точної ідентифікації плазмід у штамів виду *Salmonella enterica*.

10. Розроблено мультиплексну систему для ідентифікації роду *Salmonella* та сероварів Enteritidis і Typhimurium, яка має високу специфічність та аналітичну чутливість, яка становить для *S. Typhimurium* – 0,25, а для *S. Enteritidis* – 0,27 нг/зразок.

## ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

За результатами дисертації розроблено методичні рекомендації з індикації та диференціації бактерій роду *Salmonella* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (затверджено та прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Держспродспоживслужби України, протокол № 3 від 4 жовтня 2019 р.).

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

**Статті у наукових фахових виданнях України,  
у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних**

1. Рубленко Н. М., Дерябін О. М., Головка А. М., Пінчук Н. Г. Виявлення та аналіз поширення генів помірних бактеріофагів у штамів *Salmonella enterica*. Науковий вісник ветеринарної медицини. 2016. № 1. С. 95–102. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, узагальненні літературних даних та написанні статті).

2. Рубленко Н. М., Головка А. М., Дерябін О. М. Виявлення генів вірулентності та репліконів плазмід у *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, що були виділені впродовж 2014–2017 років на території України. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини

та біотехнологій імені С. З. Гжицького. 2018. № 20 (83). С. 405–410. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, узагальненні літературних даних та написанні статті).

3. **Рубленко Н. М.**, Дерябін О. М., Головка А. М. Індукція помірних фагів у *Salmonella enterica* subsp. *enterica* з використанням Мітоміцину С. Ветеринарна біотехнологія. 2018. № 32 (1). С. 232–238. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, узагальненні літературних даних та написанні статті).

4. Рубленко Н. М. Молекулярно-генетичні механізми виживання і резистентності сальмонел. Науковий вісник ветеринарної медицини. 2018. № 2. С. 6–12.

5. **Рубленко Н. М.**, Головка А. М. Чутливість до антибактеріальних препаратів у польових штамів *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, виділених на території України в 2014–2017 рр. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: ветеринарні науки. 2020. № 22.97. С. 58–68. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, узагальненні літературних даних та написанні статті).

6. Рубленко Н. М. Ідентифікація бактерій роду *Salmonella* та сероварів Enteritidis і Typhimurium методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ). Науковий вісник ветеринарної медицини. 2020. № 1. С. 21–31. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, узагальненні літературних даних та написанні статті).

### Методичні рекомендації

7. **Рубленко Н. М.**, Дерябін О. М., Головка О. М. Методичні рекомендації з індикації та диференціації бактерій роду *Salmonella* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. К., 2019. 14 с. (Затверджено та прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Держспродспоживслужби України, протокол № 3 від 4 жовтня 2019 р.).

### Тези наукових доповідей

8. **Rublenko N. M.**, Deriabin O. M., Pinchuk N. G., Golovko A. M. Determination and analysis of pathogenic genes proliferation in strains and isolates of *Salmonella enterica*. CBEP Ukraine Regional One Health Research Symposium and Peer Review Session. Kyiv, 2016. P. 52. (Здобувач провела аналіз наукової літератури, виконала експериментальну частину досліджень).

9. **Rublenko N. M.**, Deriabin O. M., Pinchuk N. G., Golovko A. M. Isolation and molecular characterization of avian field strains of *Salmonella enterica* during the period of 2014 through 2016 in Ukraine. CBEP Ukraine Regional One Health Research Symposium and Peer Review Session. Kyiv, 2017. P. 148. (Здобувач провела аналіз наукової літератури, виконала експериментальну частину досліджень).

10. **Рубленко Н. М.**, Дерябін О. М., Головка А. М. Молекулярна характеристика польових штамів *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar

Enteritidis, виділених від птиці. Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту: Міжнародна науково-практична конференція, м. Біла Церква, 31 жовтня 2019 року: тези доповіді. Біла Церква, 2019. С. 117–119. (Здобувач провела аналіз наукової літератури, виконала експериментальну частину досліджень).

## АНОТАЦІЯ

**Рубленко Н. М. Детекція факторів патогенності *Salmonella* spp. в полімеразній ланцюговій реакції.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2021.

У дисертації вивчено розповсюдженість сальмонельозу птиці на території України впродовж 2006–2019 рр. Проаналізовано поширеність окремих сероварів у різних регіонах, а саме – збудників пулорозу й тифу, а також нетифоїдного сальмонельозу. Встановлено поступове зменшення поширеності сальмонел серед тварин та, відповідно, у зразках харчової продукції тваринного походження, що підлягають ветеринарно-санітарному контролю. Однак, з огляду на значну частку культур серовару Gallinarum та його біовару Pullorum, проблема пулорозу і тифу птиці залишається невирішеною. Окрім того, панівними залишаються серовари Enteritidis та Typhimurium, які спричиняють у дорослої птиці інфекцію з безсимптомним перебігом, що призводить до вертикальної передачі збудника, контамінації продукції птахівництва та ускладнення епізоотологічного контролю сальмонельозу.

Методом полімеразної ланцюгової реакції проведено ідентифікацію генів, що кодують фактори патогенності: інвазія (*invA*), адгезія (*agfB*, *sefA*), ендотоксини (*prt*), колонізація (*sopE*, *gipA*, *sodCI*). Ідентифіковано гени резистентності до тетрациклінів (*tetG*), сульфаніламідів (*sulI*) та інтегрон *In104* – мобільний генетичний елемент, що у сальмонел локалізується на хромосомі. Інтегрон *In104* містить функціональні елементи, які здійснюють реплікацію генів антибіотикорезистентності.

Було визначено чутливість до антибактеріальних препаратів класу β-лактамів (амінопеніциліни: ампіцилін; цефалоспорини третього покоління: цефоперазон, цефтриаксон, цефтазидим), аміноглікозидів (гентаміцин, стрептоміцин), інгібіторів дигідрофолатредуктази (триметоприм), феніколів (хлорамфенікол) та хінолонів (налідиксова кислота, цiproфлоксацин). Проведено індукцію помірних бактеріофагів з використанням хіміотерапевтичного препарату Мітоміцин С. Розроблено набір праймерів для ідентифікації бактерій роду *Salmonella* та сероварів Enteritidis і Typhimurium.

**Ключові слова:** сальмонела, штам, гени факторів вірулентності, антибіотикорезистентність.



## АННОТАЦИЯ

**Рубленко Н. М. Детекция факторов патогенности *Salmonella spp.* в полимеразной цепной реакции.** – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни и иммунология». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2021.

В диссертации изучено распространение сальмонеллёза птицы на территории Украины в течение 2006–2019 гг. Проанализирована распространенность отдельных сероваров в различных регионах, а именно – возбудителей пулороза и тифа, а также нетифоидного сальмонеллёза. Установлено постепенное уменьшение распространенности сальмонелл среди животных и, соответственно, в образцах пищевой продукции животного происхождения, подлежащих ветеринарно-санитарному контролю. Однако, учитывая значительную долю культур серовара Gallinarum и его биовара Pullorum, проблема пулороза и тифа птицы в Украине остается нерешенной. Кроме того, доминирующими остаются серовары Enteritidis и Typhimurium, которые у взрослого поголовья птицы вызывают инфекцию с бессимптомным течением, что приводит к вертикальной передаче возбудителя, контаминации продукции птицеводства и осложнению эпизоотологического контроля сальмонеллёза.

Методом полимеразной цепной реакции проведена идентификация генов, кодирующих факторы патогенности: инвазия (*invA*), адгезия (*agfB*, *sefA*), эндотоксины (*prt*), колонизация (*sopE*, *gipA*, *sodCI*). Идентифицированы гены резистентности к тетрациклинам (*tetG*), сульфаниамидам (*sulI*) и интегрон *In104* – мобильный генетический элемент, локализирующийся на хромосоме. Интегрон *In104* содержит функциональные элементы, которые осуществляют репликацию генов антибиотикорезистентности.

Было определено чувствительность к антибактериальным препаратам класса β-лактамов (аминопенициллин: ампициллин; цефалоспорины третьего поколения: цефоперазон, цефтриаксон, цефтазидим), аминогликозидов (гентамицин, стрептомицин), ингибиторов дигидрофолатредуктазы (триметоприм), фениколов (хлорамфеникол) и хинолонов (налидиксовая кислота, ципрофлоксацин). Проведено индукцию умеренных бактериофагов с использованием химиотерапевтического препарата Митомицин С. Разработан набор праймеров для идентификации бактерий рода *Salmonella* и сероваров Enteritidis и Typhimurium.

**Ключевые слова:** сальмонелла, штамм, гены факторов вирулентности, антибиотикорезистентность.

## ANNOTATION

**Rublenko N. M. Detection of Virulence Factors of *Salmonella* spp. by a Polymerase Chain Reaction.** – Qualifying scientific research on the rights of a manuscript.

Thesis for a Candidate of Veterinary Science on specialty 16.00.03 «Veterinary Microbiology, Epizootiology, Infectious Diseases and Immunology». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2021.

The subject of this study is a prevalence of *Salmonella* spp. in Ukraine during 2006–2019. The prevalence of *Salmonella* serovars in different regions is analyzed, namely, the agents of fowl typhoid and Pullorum disease, as well as non-typhoid salmonellosis. In polymerase chain reaction we detected the genes encoding virulence factors: invasion (*invA*), adhesion (*agfB*, *sefA*), endotoxins (*prt*), colonization (*sopE*, *gipA*, *sodC1*). Also, genes conferring resistance to tetracyclines (*tetG*), sulfonamides (*sulI*) and class 1 integron *In104* – a mobile genetic element that localizes on the chromosome, have been detected. The *In104* integron contains functional elements that replicate antibiotic resistance genes. We determined susceptibility to antimicrobials of class  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, dihydrofolate reductase inhibitors, phenicols, and quinolones. Induction of temperate bacteriophages was performed using the chemotherapeutic drug Mitomycin C. A set of primers was constructed to identify bacteria of the genus *Salmonella* and serovars Enteritidis and Typhimurium.

The total number of 57 isolates of *Salmonella* were obtained from regional veterinary laboratories and isolated on poultry farms. Among the isolates, 22 belonged to Enteritidis serovar, 14 to Typhimurium serovar, 6 Gallinarum Pullorum, 4 Infantis, 3 Virchow, 2 Heidelberg, Hadar, Kentucky, and 4 *Salmonella* untypable cultures. Along with this, the object of the study was also strains of the genus *Salmonella* from the National Center of strains of the National Scientific and Control Institute of Biotechnology and Strains of microorganisms: *S. Adabraka* 1, *S. Abortusovis* 372, *S. Typhimurium* 371, *S. Typhimurium* 144, *S. Typhimurium* B, *S. Typhimurium* 3, *S. Enteritidis* P1, *S. Enteritidis* M, *S. Gallinarum* Pullorum K, *S. Gallinarum* Pullorum Stavropolsky, *S. Gallinarum* Pullorum Petelinsky, *S. Gallinarum* Pullorum 941, *S. Choleraesuis* 9, *S. Choleraesuis* 370, *S. Choleraesuis* TC-177, *S. Dublin* 373, *S. Dublin* K.

The work was performed in 5 stages. The first stage was the analysis of the spread of *Salmonella* in Ukraine in 2006–2019 based on the results of laboratory studies of the State Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Examination. In particular, we used data on the number of cases of salmonellosis in different areas from 2006 to 2019. The data analysis indicates a decrease in the spread of salmonella in Ukraine. Undoubtedly, a significant role in this is played by the implementation of the Program for the control and elimination of salmonellosis in poultry, which creates the conditions for much better epizootic control. of infection in farms.

The second stage of the work was the development of sets of primers for the identification of bacteria of the genus *Salmonella* by polymerase chain reaction

in real time. As a result of nucleotide sequence alignment and homology analysis, the following target genes were selected: *invA* for identification of the *Salmonella* genus, *fliC* for identification of *Typhimurium* serovar, gene for a hypothetical protein containing the DUF1391 domain for identification of serovar *Enteritidis*. Analytical sensitivity of the developed primer sets was: for *S. Typhimurium* – 0.25 ng/sample; for *S. Enteritidis* – 0.27 ng/sample.

In the third stage of the work, the identification of genes of pathogenicity factors and factors that could increase the virulence of salmonella isolated from poultry and strains from the collection of the National Center of Strain strains of the State Scientific and Control Institute of Biotechnology and strains of microorganisms was carried out. The identification was performed by PCR method with agarose gel electrophoresis. Genetic material was found to contain 100 % of all the strains tested, providing the main stages of the infectious process, namely: the *invA* gene, which encodes an effector protein that invades the pathogen into the periplasmic space of a eukaryotic cell. The *agfB* gene encoding the fibrin protein subunit was detected in 100 % of the strains tested, providing adhesion factor. The *sefA* gene, which encodes a SEF14-type fibrin protein, that adheres to small intestinal wall cells has been identified. The *sefA* gene is specific for *Enteritidis* serovar. The presence of the *prt* gene was found to provide cell wall synthesis in serovars belonging to the D1 group according to the White-Kauffman Scheme. Genes of moderate bacteriophages encoding colonization factors were identified: *gipA*, *sopE*, *sodC1*. Replicons of plasmids of different types – pN, pFIA, pFIIA were detected. Tetracycline resistance gene – *tetG*, sulfonamide resistance gene – *sul1* and integron In104, which is a mobile genetic element that provides the accumulation, transfer and replication of antibiotic resistance genes, have also been identified.

The fourth stage of the work was to determine the sensitivity to antibacterial drugs. High resistance to quinolones in the field strain group was found: 71.93 % of resistant strains to nalidixic acid and 80.70 % to ciprofloxacin. The lowest resistance was set for trimethoprim – 28.07 % and streptomycin – 33.33 %. In the group of strains from the NSCSM collection, high sensitivity to all antibacterial drugs was established. Sensitivity was determined by disc diffusion with CLSI breakpoints.

In the fifth stage of the study, the induction of moderate bacteriophages was performed using mitomycin C. The results of the studies were determined by the titer of induced bacteriophages phenotypically manifested by the lysis zone of *Salmonella* cultures on the surface of the solid nutrient medium. In the NSCSM strain group, the highest titer was  $4 \times 10^4$ , the lowest was  $1 \times 10^4$ . No lysis zones were detected in five strains (*Typhimurium* 141, *Enteritidis* M, *Gallinarum Pullorum* Stavropol, *Choleraesuis* TC-177, *Dublin* K). Among the isolates of *S. Typhimurium*, no lysis zones were detected in only four: *S. Typhimurium* 000173, *S. Typhimurium* 16, *S. Typhimurium* VM4, *S. Typhimurium* M1003.

**Key words:** salmonella, strain, virulence factor genes, antibiotic resistance.

Підписано до друку 18.03.2021 року.      Формат 60x84\16  
Ум. друк. арк. 0,9                                      Обл.-вид.арк. 0,9  
Наклад 100 прим.                                      Зам. № 210128

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України  
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, тел.: 527-81-55, e-mail: nubip\_druk@ukr.net  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4097 від 17.06.2011







