

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ
БІОТЕХНОЛОГІЙ І ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ**
**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ**
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

РУБЛЕНКО НАТАЛІЯ МИХАЙЛІВНА

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

ДИСЕРТАЦІЯ

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

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,

інфекційні хвороби та імунологія

Галузь знань: 211 Ветеринарна медицина

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ Рубленко Н. М.

Науковий керівник:
Головко Анатолій Миколайович,
доктор ветеринарних наук, професор,
академік НААН

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» (211 – Ветеринарна медицина). – Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ, 2021.

У дисертаційній роботі вивчено розповсюдженість бактерій роду *Salmonella* в Україні протягом 2006–2019 років. Проаналізовано поширеність окремих сероварів в різних регіонах, а саме – збудників пулорозу й тифу, а також нетифоїдного 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 консервативну послідовність інтегрону *In104* – мобільного генетичного елементу, 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 3 покоління: цефоперазон, цефтриаксон, цефтазидим), аміноглікозидів (гентаміцин, стрептоміцин), тетрациклінів (тетрациклін, доксициклін), інгібіторів дигідрофолатредуктази (триметоприм), феніколів (хлорамфенікол) та хінолонів (налідиксова кислота, ципрофлоксацин). Проведено індукцію помірних бактеріофагів з використанням хіміотерапевтичного препарату мітоміцин С. Розроблено набір праймерів для ідентифікації бактерій роду *Salmonella* та сероварів Enteritidis та Typhimurium.

Матеріалом для дослідження були 57 польових штамів роду *Salmonella*, що надходили із регіональних лабораторій ветеринарної медицини, а також

ізоляти, виділені зі змивів, взятих на території птахогосподарств. Серед польових штамів 22 належали до серовару Enteritidis, 14 – до серовару Typhimurium, 6 Gallinarum Pullorum, 4 – Infantis, 3 Virchow, 2 Heidelberg, 1 Nadar, 1 Kentucky та 4 нетипованих культури роду *Salmonella*. Поряд із цим об'єктом дослідження також були штами роду *Salmonella*, що належать Національному центру штамів НЦШМ Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів: *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* Ставропольський, *S. Gallinarum Pullorum* Петелінський, *S. Gallinarum Pullorum* 941, *S. Choleraesuis* 9, *S. Choleraesuis* 370, *S. Choleraesuis* TC-177, *S. Dublin* 373, *S. Dublin* K.

Робота виконувалась у 5 етапів. *Першим етапом* був аналіз 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 по 2019 рік. Також використовували інформацію про серологічні варіанти сальмонел, виділених із продуктів та сировини тваринного походження державними лабораторіями ветеринарної медицини у ході виконання Програми лабораторного контролю за сальмонельозом (Наказ № 310 від 19.09.2016 «Про затвердження Інструкції з профілактики та ліквідації сальмонельозу птиці»). Встановлено, що у структурі захворюваності птиці найбільше значення має серовар Gallinarum та його біовар Pullorum, масова частка яких становила 23,84 % серед серологічних варіантів сальмонел, виділених державними лабораторіями ветеринарної медицини у 2015 році. У цій структурі кількість культур, що відносились до серовару Typhimurium становила 28,45 %. У 2016 році кількість серовару Gallinarum-Pullorum становила 34,96 %. Кількість культур серовару Typhimurium зменшилась і становила 10,48 %, Enteritidis – 13,28 %. З 2006 по 2008 рік найбільшу кількість

випадків сальмонельозу реєстрували у Харківській, Донецькій, Дніпропетровській, Кіровоградській та Херсонській областях. Протягом наступних років кількість випадків сальмонельозу в даних областях дещо зменшувалась, проте зростала у Запорізькій, Сумській та Хмельницькій областях. У 2015–2016 рр. в а найбільшу кількість випадків реєстрували у Кіровоградській, Полтавській та Донецькій областях. У 2016 році найбільшу кількість культур сальмонел було виділено державними лабораторіями ветеринарної медицини у Харківській та Донецькій областях. З них 90% та 70 % відповідно відносились до серовару Gallinarum Pullorum. Протягом 2017–2019 років найбільшу кількість сальмонел виділяли у Сумській, Донецькій та Луганській областях, при цьому у серологічній структурі домінували серовари Enteritidis, Typhimurium та Gallinarum.

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 Національного центру штамів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. Ідентифікацію проводили методом ПЛР з електрофорезом в агарозному гелі. Встановлено, що у генетичному матеріалі 100 % усіх досліджених штамів наявні гени, що забезпечують перебіг основних етапів інфекційного процесу, а саме: ген *invA*, який кодує ефекторний білок, що забезпечує інвазію збудника у периплазматичний простір еукаріотичної клітини. У 100 % досліджених штамів було виявлено ген *agfB*, що кодує субодиницю білка фімбрину, забезпечуючи фактор адгезії. Було ідентифіковано ген *sefA*, який кодує білок фімбрій типу SEF14, що здійснюють адгезію до клітин стінки тонкого кишечника. Ген *sefA* є специфічним для серовару Enteritidis. Було встановлено наявність гену *prt*, що забезпечує синтез клітинної стінки у сероварів, що відносяться до групи D1 за класифікацією Вайта-Кауффмана. Було ідентифіковано гени помірних бактеріофагів, які кодують фактори колонізації: *gipA*, *sopE*, *sodC1*. Виявлено реплікони плазмід різних типів – *pN*, *pFIA*, *pFIIA*. Також було ідентифіковано ген резистентності

до тетрацикліну – *tetG*, ген резистентності до сульфаніламідів – *sulI* та консервативну послідовність інтегрону *In104*, який є мобільним генетичним елементом, що забезпечує накопичення, перенесення та реплікацію генів антибіотикорезистентності.

Третім етапом роботи було визначення чутливості до антибактеріальних препаратів класу β -лактамів (амінопеніциліни: ампіцилін; цефалоспорины 3 покоління: цефоперазон, цефтриаксон, цефтазидим), аміноглікозидів (гентаміцин, стрептоміцин), тетрациклінів (тетрациклін, доксициклін), інгібіторів дигідрофолатредуктази (триметоприм), феніколів (хлорамфенікол) та хінолонів (налідиксова кислота, ципрофлоксацин). Встановлено високу резистентність до препаратів класу хінолонів в групі польових штамів: 71,93 % резистентних штамів до налідиксової кислоти та 80,70 % – до ципрофлокласину. Найнижча резистентність була встановлена до триметоприму – 28,07 % та стрептоміцину – 33,33 %. У групі штамів з колекції НЦШМ було встановлено високу чутливість до всіх антибактеріальних препаратів. Чутливість визначали методом диск-дифузії з інтерпретацією результатів за критеріями CLSI.

На четвертому етапі досліджень було проведено індукцію помірних бактеріофагів з використанням мітоміцину С. Результати досліджень визначали за титром індукованих бактеріофагів, що фенотипово проявлялись зоною лізису культур сальмонел на поверхні твердого поживного середовища. У групі штамів з колекції НЦШМ найвищий титр становив 4×10^4 , найнижчий – 1×10^4 . У п'яти штамів (*Typhimurium* 141, *Enteritidis* M, *Gallinarum* Pullorum Ставропольський, *Choleraesuis* TC-177, *Dublin* K) зон лізису не було виявлено. Серед ізолятів *S. Typhimurium* зон лізису не було виявлено лише у чотирьох: *S. Typhimurium* 000173, *S. Typhimurium* 16, *S. Typhimurium* VM4, *S. Typhimurium* M1003. У ізолятів *S. Enteritidis* 4L, *S. Enteritidis* 9, *S. Enteritidis* 10M, *S. Enteritidis* GT не спостерігали зон лізису. Зон лізису не виявлено у наступних польових штамів: *S. Infantis* PN, *S. Gallinarum* 15, *S. Gallinarum* 0312, *S. Gallinarum* N18, *S. Heidelberg* 1, *S. Kentucky*.

П'ятим етапом роботи була розробка 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 (Сполучені Штати Америки), EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека) та DDBJ (Японська база даних ДНК). В 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. Аналітична чутливість розроблених наборів праймерів становила: для *S. Typhimurium* – 0,25 нг/зразок; для *S. Enteritidis* – 0,27 нг/зразок.

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

SUMMARY

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" (211 - Veterinary medicine). - State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, 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*, *sodCI*). Also, genes conferring resistance to tetracyclines (*tetG*), sulfonamides (*sulI*) and conservative sequence of 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 β -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 at poultry farms. Among the isolates, 22 belonged to Enteritidis, 14 to Typhimurium, 6 Gallinarum Pullorum, 4 Infantis, 3 Virchow, 2 Heidelberg, 1 Hadar, 1 Kentucky, and 4 untypable cultures of genus *Salmonella*. The object of the study were 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. Also used information about serological variants of salmonella isolated from products and raw materials of animal origin by state veterinary laboratories during the implementation of the Salmonellosis Laboratory Control Program (Order # 310 of 09/19/2016 "On Approval of the Instructions for the Prevention and Elimination of Salmonellosis). *Gallinarum* serovar and its *Pullorum* biovar, with a mass fraction of 23.84 % among serological variants of salmonella released by the state veterinary laboratories in 2015, is of the highest importance in the structure of bird disease. In this structure, the number of cultures associated with the serovar Typhimurium was 28.45 %. In 2016, the amount of *Gallinarum*-*Pullorum* serovar was 34.96 %. The number of Typhimurium serovar cultures decreased to 10.48 %, *Enteritidis* to 13.28 %. From 2006 to 2008, the highest number of salmonellosis cases were recorded in Kharkiv, Donetsk, Dnipropetrovsk, Kirovohrad and Kherson regions. In the following years, the number of cases of salmonellosis in these areas decreased slightly, but increased in Zaporizhia, Sumy and Khmelnytsky regions. In 2015-2016, the highest number of cases was registered in Kirovograd, Poltava and Donetsk regions. In 2016, the largest number of salmonella crops was allocated by state veterinary laboratories in Kharkiv and Donetsk regions. Of these, 90 % and 70 %, respectively, were related to *Gallinarum*-*Pullorum* serovar.

In the second 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 – *sulI* and conservative sequence of integron *In104*, which is a mobile genetic element that provides the accumulation, transfer and replication of antibiotic resistance genes, have also been identified.

The third stage of the work was to determine the sensitivity to antibacterial drugs of the class β -lactams (aminopenicillins: ampicillin; cephalosporins of the 3rd generation: cefoperazone, ceftriaxone, ceftazidime), aminoglycosides (gentamicin, streptomycin), tetracyclines (tetracycline, doxycycline), dihydrofolate reductase inhibitors (trimethoprim), chloramphenicol, quinolones (ciprofloxacin, nalidixic acid). 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.

The fourth stage of the study, the induction of temperate 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 4×10^4 , the lowest was 1×10^4 . 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. The isolates of *S. Enteritidis* 4L, *S. Enteritidis* 9, *S. Enteritidis* 10M, *S. Enteritidis* GT did not observe the lysis zones. Areas of lysis were not detected in the following field strains: *S. Infantis* PN, *S. Gallinarum* 15, *S. Gallinarum* 0312, *S. Gallinarum* N18, *S. Heidelberg* 1, *S. Kentucky*.

The fifth 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. To this end, 97 whole-genome sequences of various *Salmonella* serovars from the GenBank (US), EMBL (European Molecular Biology Library) and DDBJ (DNA Database of Japan) sequences were analyzed. 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.

Keywords: *salmonella*, strain, virulence factor genes, antibiotic resistance.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Рубленко, Н. М., Дерябін, О. М., Головко, А. М., Пінчук, Н. Г. (2016). Виявлення та аналіз поширення генів помірних бактеріофагів у штаммах *Salmonella enterica*. *Науковий вісник ветеринарної медицини*, (1), 95-102. (Дисертантка брала безпосередню участь у проведенні досліджень, в узагальненні літературних даних та написанні статті).

2. **Рубленко, Н. М.,** Головка, А. М., Дерябін, О. М. (2018). 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 СЗ Гжицького*, 20(83). 405-410. (Дисертантка брала безпосередню участь у проведенні досліджень, в узагальненні літературних даних та написанні статті).
3. **Рубленко, Н. М.,** Дерябін, О. М., Головка, А. М. (2018). Індукція помірних фагів у *Salmonella enterica subsp. enterica* з використанням Мітоміцину С. *Ветеринарна біотехнологія*, (32 (1)), 232-238. (Дисертантка брала безпосередню участь у проведенні досліджень, в узагальненні літературних даних та написанні статті).
4. **Рубленко Н. М.** (2018) Молекулярно-генетичні механізми виживання і резистентності сальмонел. *Науковий вісник ветеринарної медицини: Епізоотологія та інфекційні хвороби* 2 2(2018), 6-12.
5. **Рубленко Н. М.,** Головка А. М. Чутливість до антибактеріальних препаратів у ізолятів *Salmonella enterica subsp. enterica*, виділених на території України в 2014–2017 рр. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні Науки* 22.97 (2020): 58-68. (Дисертантка брала безпосередню участь у проведенні досліджень, в узагальненні літературних даних та написанні статті).
6. **Рубленко Н. М.,** Дерябін О. М., Головка А. 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. (Дисертантка брала безпосередню участь у проведенні досліджень, в узагальненні літературних даних та написанні статті).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Тези наукових доповідей:

7. **Rublenko N.M.,** Deriabin O.M., Pinchuk N.G., Golovko A.M. (2016). 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, 52. *(Дисертантка провела аналіз наукової літератури, виконала експериментальну частину досліджень).*
8. **Rublenko N.M.,** Deriabin O.M., Pinchuk N.G., Golovko A.M. (2017). 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, 148. *(Дисертантка провела аналіз наукової літератури, виконала експериментальну частину досліджень).*
9. **Рубленко Н.М.,** Дерябін О. М., Головко А. М. (2019). Молекулярна характеристика ізолятів *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Enteritidis*, виділених від птиці. *Міжнародна науково-практична конференція “Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту” за напрямками: “Актуальні проблеми ветеринарної медицини”*, м. Біла Церква. *(Дисертантка провела аналіз наукової літератури, виконала експериментальну частину досліджень).*

Методичні рекомендації:

10. **Рубленко Н. М.,** Дерябін О. М., Головко О. М. Методичні рекомендації з індикації та диференціації бактерій роду *Salmonella* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Київ, 2019. 14 с.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, скорочень, символів.....	14
Вступ.....	16
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	24
1.1. Епізоотологічні особливості сальмонельозу птиці.....	24
1.2. Біологічні властивості збудника.....	31
1.2.1. Роль факторів патогенності у патогенезі захворювання.....	32
1.2.2. Генетична детермінація факторів патогенності.....	34
1.2.2.1. Гени резистентності до антибактеріальних препаратів.....	40
1.2.2.2. Гени помірних бактеріофагів.....	44
1.3. Лабораторна діагностика сальмонельозу птиці.....	45
1.4. Заключення з огляду літератури	46
Розділ 2. ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ	48
2.1. Виділення чистих культур ізолятів сальмонели.....	52
2.2. Проведення серологічної типізації ізолятів сальмонели.....	53
2.3. Визначення чутливості антибактеріальних препаратів.....	56
2.4. Індукція помірних фагів з використанням хіміотерапевтичного препарату Мітоміцин С.....	57
2.5. Підбір праймерів для детекції генів факторів патогенності.....	58
2.6. Розроблення системи діагностики сальмонельозу птиці методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.....	60
2.7. Методи статистичної обробки результатів досліджень.....	61
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	62
3.1. Моніторинг розповсюдження сальмонел в Україні (2006 – 2019).....	62
3.2. Виділення ізолятів виду <i>Salmonella enterica</i> та визначення серотипу в реакції аглютинації за схемою Вайта-Кауфмана	73
3.3. Детекція генів факторів патогенності методом полімеразної ланцюгової реакції.....	82

3.3.1. Детекція генів інвазії (<i>invA</i>), адгезії (<i>agfB</i> , <i>sefA</i>) та компонента бактеріальної клітинної стінки (<i>prt</i>).....	82
3.3.2. Детекція генів помірних бактеріофагів: <i>gipA</i> , <i>sopE</i> , <i>sodC1</i>	87
3.3.3. Детекція репліконів плазмід.....	90
3.3.4. Детекція генів резистентності до тетрацикліну (<i>tetG</i>), сульфаніламідів (<i>sulI</i>) та консервативної послідовності інтегрону In104 (5'-3'CS).....	94
3.4. Визначення чутливості до антибактеріальних препаратів.....	96
3.5. Індукція помірних фагів з використанням Мітоміцину С.....	103
3.6. Розроблення системи діагностики сальмонельозу методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.....	109
Розділ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	119
Висновки	138
Пропозиції виробництву.....	140
Список використаних джерел.....	141
Додатки.....	184

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AMP – ампіцилін;
ATCC – American type culture collection;
BHQ – Black Hole Quencher;
C – хлорамфенікол;
CAZ – цефтазидим;
CDC – Centre for Disease Control;
CIP – ципрофлоксацин;
CLSI – The Clinical and Laboratory Standards Institute;
CPZ – цефоперазон;
Ct – Cycle threshold, пороговий цикл;
CTR – цефтриаксон;
Cy5 – флюорофор (652 нм / 672 нм);
DDBJ – DNA Data Bank of Japan;
DO – доксициклін;
ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control;
EFSA – European Food Safety Authority;
EMBL – The European Molecular Biology Laboratory;
EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing;
FAM – флюорофор (490 нм / 520 нм);
GEN – гентаміцин;
GLASS – Global Antimicrobial Resistance Surveillance System;
HEX – флюорофор (535 нм / 556 нм);
ISO – International Organization for Standardization;
LOD – limit of detection;
MIC – minimal inhibitory concentration;
MLST – Multilocus sequence typing;
NA – налідиксова кислота;
NCTC – National Collection of Type Cultures;
PMQR – Plasmid-mediated quinolone resistance;

QRDR – quinolone resistant-determining region;
S – стрептоміцин;
SCV – Salmonella containing vacuole;
SD – стандартне відхилення;
SPI – Salmonella Pathogenicity Island;
T – тетрациклін;
TET – флюорофор (521 нм / 536 нм);
TR – триметоприм;
T3SS – Type 3 Secretion System;
WGS – Whole genome sequencing;
WHO – World Health Organization;
XLD – xylose-lysine deoxycholate;
АТФ – аденозинтрифосфорна кислота;
БУО – бляшкоутворюючі одиниці;
ВІЗ – ветеринарні імунобіологічні засоби;
ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;
ДНКІБШМ – Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів;
ЛПС – ліпополісахаридна стінка;
МЕБ – Міжнародне епізоотичне бюро;
ММО – м'ясо механічного обвалення;
МПА – м'ясо-пептонний агар;
МПБ – м'ясо-пептонний бульйон;
мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота;
НЦШМ – Національний центр штамів мікроорганізмів;
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;
ПЛР-РЧ – полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі;
РА – реакція аглютинації;
РНК – рибонуклеїнова кислота;

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Нині птахівництво – одна із найбільш потужних галузей аграрного виробництва. З початку 2000-х споживання продуктів птахівництва, зокрема курячого м'яса та яєць, в світі зросло майже вдвічі [1–3]. В Україні частка продукції птахівництва у структурі виробництва м'яса становить більше половини – 51,1 %, відповідно зростає і поголів'я птиці – від 123,7 млн. голів у 2000 до 201,7 млн у 2016 році [4–5].

Основним інфекційним агентом, що спричинює контамінацію продукції птахівництва, є бактерії роду *Salmonella* [6–8]. Їх джерелом здебільшого є корми та хвора птиця [9–10]. Сальмонельозна інфекція може перебігати як за типових клінічних симптомів, так і субклінічно [11–12].

Серед сероварів сальмонел розрізняють адаптовані, частково адаптовані та неадаптовані [13]. У випадку адаптованої інфекції, молодняк птиці уражається сероварами *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, що викликає пулороз або тиф [14–15]. До цієї групи також відносять *S. Dublin*, *S. Abony* – серовари, що викликають системну інфекцію у великої рогатої худоби та овець. Серовар *S. Choleraesuis* є збудником сальмонельозу у свиней [16–17].

Частково адаптованою є інфекція, що спричиняється сероварами *S. Typhimurium* та *S. Enteritidis*, яка перебігає безсимптомно у дорослої птиці [18]. Контамінація продукції птахогосподарств цими сероварами може призвести до спалаху харчових інфекцій серед людей [19–20].

В Україні впродовж 10 років зберігається тенденція збільшення циркуляції сероварів *S. Enteritidis* [21–22]. У 2015 році частка цих сальмонел, виділених з патологічного матеріалу, становила 5,9 % [23].

Поряд з цим досі одними з найбільш поширених ізолятів сальмонел в Україні, які виділяють при моніторингу, є збудники пулорозу і тифу – *Pullorum* та *Gallinarum* [24]. У 2015 році за результатами бактеріологічних досліджень патологічного та біологічного матеріалу птиці ізоляти *Pullorum*, *Gallinarum* та середній варіант *Gallinarum-Pullorum* становили 28,4 % [23]. У Харківській області лабораторіями ветеринарної медицини протягом 2010 – 2015 років 23,3

% випадків захворювань тварин і птиці припадають на сальмонельоз та пулороз, серед збудників яких переважають бактерії серовару *S. Gallinarum* – 71,8 % від загальної кількості культур [25]. Найбільшу питому вагу 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* – 35,1 %, 28,9 % та 48,9 %, відповідно [26].

Циркуляція сальмонел в межах господарств промислового птахівництва спричинена особливістю перебігу інфекції серед поголів'я. Оскільки у дорослих особин інфекція перебігає субклінічно та передається вертикальним шляхом. Внаслідок цього інфікованими є яйця та молодняк. Бактерії персистують в печінці, селезінці, легенях та яйцепровадах [27]. Інфікована птиця з безсимптомним перебігом інфікує воду, корми, предмети догляду та підстилку [28]. Таким чином, від невеликої частини хворого поголів'я або внаслідок згодовування контамінованих кормів, може інфікуватися все стадо.

Ще одним фактором, який ускладнює контроль та можливі шляхи ліквідації сальмонельозу є значна антигенна різноманітність збудника, здатність виробляти резистентність до антибактеріальних препаратів та фактори, що підвищують патогенність окремих популяцій [29–32].

В таких умовах постають два основних питання: забезпечення ефективності на всіх етапах виробництва, що передбачає оцінку ризиків, якими в першу чергу є занесення інфекції у промислові птахогосподарства та як наслідок – інфікування поголів'я, що призводить до значних економічних збитків. Другим важливим питанням є безпечність харчової продукції галузі птахівництва.

На сьогодні для контролю над сальмонельозною інфекцією розроблено програми, що дозволяють охопити малі приватні господарства та великі промислові підприємства з виробництва м'яса птиці та яєць і яєчних продуктів [33–35]. В Україні з 2016 року 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. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (ПЛР-РЧ) є одним із найбільш перспективних методів. Основна відмінність ПЛР-РЧ від класичного варіанту – збільшена чутливість, специфічність та скорочення часу до отримання результату [36–37]. Низкою досліджень [38–40] виявлено окремі генетичні детермінанти транспорту бактеріальних білків, синтезу систем кислотного і теплового шоку та протидії фагоцитозу. На жаль, в Україні такі дослідження поодинокі [41].

Ідентифікація таких ділянок у ізолятів, що циркулюють на території України дозволить отримати додаткові дані щодо них та скласти цілісну картину щодо цих груп мікроорганізмів. А в умовах стрімкого зростання антибіотикорезистентності необхідним є не лише систематичний нагляд за чутливістю бактеріальних популяцій, а й вивчення молекулярних основ резистентності.

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 і 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:

- 1) провести моніторинг лабораторних досліджень в Україні (2006–2019 рр.) щодо розповсюдження бактерій роду *Salmonella*;
- 2) провести виділення чистих культур ізолятів сальмонел із господарств з вирощування бройлерів та виробництва яєць та сформувати вибірку польових штамів;
- 3) дослідити чутливість польових та музейних штамів сальмонели до антибактеріальних препаратів;
- 4) встановити молекулярно-біологічні характеристики польових і музейних штамів сальмонел щодо наявності помірних бактеріофагів за індукції хіміотерапевтичним препаратом Мітоміцин С;
- 5) дослідити наявність та поширеність генів патогенності, антибіотикорезистентності та репліконів плазмід серед польових та музейних штамів сальмонел;
- 6) розробити на підставі встановлених молекулярно-біологічних властивостей мультиплексну 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 НЦШМ *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 НЦШМ. Водночас у польових та музейних штамів виявлено гени, що забезпечують синтез факторів колонізації – *gipA*, *sodCI*, *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 інтегрону, 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 консервативної ділянки інтегрону з хромосомною локалізацією у польових та музейних штамів *Salmonella enterica* є підставою для удосконалення системи контролю за антибіотикорезистентністю бактерій. У колекції Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ 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, Інституту післядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини БНАУ, 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 матеріалів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідались, обговорювалися та отримали позитивну оцінку на науковому симпозіумі в межах концепції «Єдине здоров'я» (м. Київ 2016, 2017 рр.), на 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. Загальних обсяг дисертації становить 201 сторінку. Робота ілюстрована 16 таблицями та 37 рисунками. Список використаних джерел включає 416 найменувань, у тому числі 387 латиницею.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Епізоотологічні особливості сальмонельозу птиці

У загальній структурі патології птиці сальмонели мають особливе значення, оскільки через високу антигенну різноманітність можуть викликати як спалахи захворюваності у господарствах, наслідком яких є високий падіж, так і субклінічний інфекційних процес [42–44]. При цьому значно знижується продуктивність птиці та відбувається контамінація м'яса і яєць.

Номенклатура антигенної структури сальмонел періодично оновлюється Референтним центром з дослідження сальмонел ВООЗ – WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Відповідно до останньої редакції, що була опублікована у 2007 році, рід *Salmonella* включає 2579 сероварів. Серед них 22 відносять до виду *bongori*, а 2557 – до виду *enterica* [45]. Серовари виду *bongori* найчастіше виділяють від холоднокровних тварин, також вони є збудниками сальмонельозу у ссавців та людей [46]. Щодо інфікування птиці сальмонелами виду *bongori* у науковій літературі є мало даних, описані лише поодинокі випадки виділення сальмонел виду *bongori* з курячих яєць та від синантропних птахів [47–48]. З цього можна зробити висновок, що *bongori* не має значного впливу на епізоотичних процес у птиці.

При моніторингу епізоотичної ситуації в птахогосподарствах та дослідженні біологічного матеріалу птиці найчастіше виділяють серовари, що відносяться до виду *enterica*: Gallinarum, Pullorum, Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Virchow [49]. Перебіг інфекційного процесу при зараженні цими сероварами має свої особливості залежно від виду тварин. Розрізняють серовари специфічні для певного виду тварин та убіквітарні. З огляду на це виділяють адаптовані, частково адаптовані та неадаптовані серовари.

Адаптовані серовари – це серовар Gallinarum та його біовар Pullorum, які є збудниками тифу і пулорозу, відповідно, у птиці [50]. Іноді до адаптованої групи інфекцій відносять сальмонельоз індиків, викликаний підвидом *arizonae* [51]. Останній включає в себе 99 сероварів [45]. Однак ізоляти даного підвиду

часто виділяють і від інших видів птиці та від ссавців, у тому числі від людини [52–54]. При цьому відмічають, що природним резервуаром *arizonae* є рептилії [55]. Серовари *Gallinarum* та *Pullorum* часто є причиною високої смертності поголів'я, при цьому характерною особливістю є збереження сальмонелозності у дорослої птиці [56].

Серовари *Pullorum* та *Gallinarum* найчастіше викликають захворювання у курчат, індиків та фазанів, рідше – у перепелів, качок, цесарок та павичів [7]. Смертність може досягати 100 %. Це залежить в першу чергу від віку птиці, вгодованості, умов утримання та наявності супутніх інфекцій, оскільки відомо, що за несприятливих умов знижується резистентність сальмонелозіїв [7–8]. Сальмонела у перехворілої локалізується в яєчниках та інфікує яйця через яйцепроводи, тому джерелом заносу інфекції у господарство найчастіше є інфіковані яйця [57–58]. Найбільш сприйнятливою є птиця віком до двох тижнів, надалі резистентність до збудника посилюється [59].

Впровадження державних програм, спрямованих на ліквідацію пулорозу і тифу птиці дозволило зменшити циркуляцію збудників серед свійської птиці в багатьох країнах. Відомо, що останній спалах пулорозу у Сполучених Штатах Америки зафіксовано у 1991 [60]. Хоча відмічається, що *Pullorum* досі зберігається у домашньої та дикої птиці [61]. Серед країн Південної Америки пулороз поширений в Бразилії, Аргентині, Уругваї [62–63]. На сьогодні серовари *Gallinarum*-*Pullorum* поширені здебільшого в Азії, в Нігерії, Пакистані [64–65].

У травні 2019 року зафіксовано спалах пулорозу в Данії, спричинений біоваром *Pullorum* у стадах курчат фазанів [66]. В Україні збудники пулорозу і тифу птиці досі є одними з найбільш поширених ізолятів сальмонел, які виділяють при моніторингу [67]. У 2015 році за результатами бактеріологічних досліджень патологічного та біологічного матеріалу птиці ізоляти *Pullorum*, *Gallinarum* та середній варіант *Gallinarum*-*Pullorum* становили 28,4 % [23]. У Харківській області лабораторіями ветеринарної медицини протягом 2010 –

2015 років 23,3 % випадків захворювань тварин і птиці припадають на сальмонельоз та пулороз, серед збудників яких переважають бактерії серовару *S. Gallinarum* – 71,8 % від загальної кількості культур [24].

Частково адаптованими збудниками є серовари *Enteritidis* та *Typhimurium*, які викликають сальмонельоз у молодняку птиці, а в дорослого поголів'я перебігають субклінічно [68–69]. Однак у інфікованої дорослої птиці відмічають зниження продуктивності та інтенсивну колонізацію кишечника, внаслідок чого відбувається контамінація підстилки, кормів та води фекаліями, що містять сальмонелу [70–71]. Зниження несучості також може відбуватись внаслідок ураження фолікул. Для сальмонел характерний трансваріальний шлях передачі, аліментарний та аерогенний [72]. При виявленні сальмонели у господарстві, джерелом занесення часто є інкубаторій, куди надходять інфіковані яйця [73].

З метою контролю сальмонельозу ветеринарно-санітарні заходи здійснюються у стадах бройлерів, індиків, свиней, великої рогатої худоби. Моніторингу також підлягає м'ясо птиці та яйця [13, 74].

Доросла птиця переносить інфекцію безсимптомно та передає збудник вертикально [75–79]. Також відбувається контамінація кормів, води, підстилки та зараження здорового поголів'я. Через це продукція птахівництва – яйця та м'ясо – може бути контамінованою нетифоїдними сальмонелами, які можуть викликати сальмонельоз у людей [80–82]. Таким чином проблема сальмонельозу має два фактори: адаптовані та неадаптовані (або частково адаптовані) серовари. У першому випадку виникає висока смертність поголів'я птиці, зменшення продуктивності, що наносить значні економічні збитки. В першу чергу це витрати на протиепізоотичні заходи, що включають дезінфекцію, оновлення стад і вакцинацію. Адаптовані та частково адаптовані серовари становлять небезпеку в першу чергу для безпечності харчової продукції. Тому моніторинг епізоотичної ситуації в промислових господарствах є першою ланкою у процесі забезпечення ветеринарно-санітарного контролю. У країнах Європейського Союзу контроль сальмонел

здійснюється відповідно до нормативного документу (ЕС) 2160/2003 та директиви 2003/99/ЕС, що передбачає моніторинг зоонозів та їхніх збудників [83 – 84].

В країнах Європейського Союзу протягом періоду 2014–2016 зафіксовано 147 спалахів сальмонельозу, викликаного сероваром Agona, які охоплювали території Об'єднаного Королівства, Фінляндії, Данії, Німеччини та Ірландії [85]. В результаті секвенування було виявлено близьку генетичну спорідненість ізолятів, які відрізнялись один від одного лише кількома алелями [86]. У період 2017 – 2018 у Чехії було відмічено збільшення випадків сальмонельозу серед людей, викликаних ізолятами *S. Bareilly* (серовар відносить до виду *enterica*, підвиду *enterica*, групи C1) [87]. Цей серовар часто виділяють в господарствах, де утримуються бройлери [88]. При дослідженні випадків сальмонельозу, викликаних *S. Bareilly* методами молекулярного типування (WGS, MLST) встановлювали генетичну спорідненість, що вказує на яйця як джерело контамінації та відповідно причину спалахів сальмонельозу в людей [89–91].

Встановлено, що у Європі близько 11 % стад бройлерів контаміновано сероварами Enteritidis та Typhimurium [92]. Поряд з ними, найбільш розповсюдженими серед бройлерів є такі серовари як Mbandaka, Nadar та Infantis [93–97]. В Єгипті найпоширенішими у господарствах з утримання птиці є Enteritidis та Typhimurium [98].

За результатами моніторингу відомо, що у 2004 році в Європі близько 6,4 % батьківських стад курей було інфіковано сальмонелами, у 2005 році цей відсоток знизився до 5,7 % [99]. Більшість ізолятів, виділених у ході моніторингу відносились до сероварів Enteritidis та Typhimurium. У Португалії та Словенії всі стада, в яких виявляли сальмонелу, були інфіковані сероваром Enteritidis. Виняток становили лише Об'єднане Королівство та Іспанія, де домінували інші серовари. У стадах бройлерів у 2004 та 2005 роках були інфіковані 3,3 % та 5,2 % відповідно. Серед них також переважали серовари Enteritidis та Typhimurium. У 2005 році було проведено також моніторинг

сальмонели серед качок, що утримувались у промислових птахогосподарствах. Найбільший відсоток інфікованого поголів'я виявили у Польщі (15,3 %), Австрії (8,7 %), Бельгії (7,1 %) та Німеччині (7,5 %). Домінуючим у Польщі та Австрії були серовари Enteritidis та Typhimurium, у Німеччині – Typhimurium. Імовірно, що один із джерел сальмонели в інфікованих птахогосподарствах були корми, оскільки контамінацію кормів сероваром Enteritidis було виявлено в Італії та Нідерландах, Typhimurium – у Фінляндії та Німеччині.

У період 2005 року в Європі було зафіксовано 176395 випадків сальмонельозу в людей. Більшість виділених ізолятів належала до сероварів Enteritidis та Typhimurium [100]. Основна маса зареєстрованих випадків сальмонельозу була викликана споживанням курячого м'яса, дещо менша – м'яса свинини. Процент інфекції, джерелом якої були курячі яйця коливався від 0 до 6 %. В наступному році кількість випадків сальмонельозу серед людей дещо зменшилась і становила 160649 випадків [101]. З них – близько 59,6 % були викликані сероваром Enteritidis. За результатами бактеріологічних досліджень харчових продуктів найбільший відсоток контамінованих зразків було виявлено у м'ясі бройлерів (рис 1.1).



Рис. 1.1. Результати моніторингу наявності сальмонел у харчовій продукції в країнах Європейського Союзу в 2006 році

Серед м'яса бройлерів домінував також серовар *Enteritidis*. У 2007 ситуація було майже незмінною: м'ясо бройлерів мало найбільший відсоток контамінації серед інших харчових продуктів – 6,8 %, однак домінуючим сероваром був *S. Kentucky* (17,5 % серед усіх виділених сероварів). Масова частка *Enteritidis* становила 16,5 % [102].

Протягом наступних років прослідковується тенденція до зменшення поширеності сальмонел у стадах курей-несучок та бройлерів. Починаючи з 2004 року відсоток сальмонел у бройлерів зменшувався з 3,3 % у 2004 до 2,8 % у 2008 році [103–104]. Досить значне збільшення спостерігалось у 2009–2010 роках, після чого відбувався зменшення до 2,22 % у 2015 [105–106]. Разом з тим у 2009 році різко знизилась масова частка *Enteritidis* серед виділених сероварів, натомість почала зростати частка інших сероварів, що підлягають моніторингу – *Infantis*, *Virchow*, *Nadar* та інших [107]. У 2015 році *Enteritidis* та *Typhimurium* становили певну частку ізолятів, проте основна маса належала іншим нетифоїдним сероварам. У стадах курей несучок спостерігалась схожа динаміка зі зростанням контамінації у 2009 – 2010 роках та поступовим зменшенням, починаючи з 2012 року [108]. Хоча, варто зазначити, що у 2016 році відсоток сальмонел у стадах курей-несучок збільшився, порівняно з 2015, і домінувати знову почав серовар *Enteritidis* (рис. 1.2) [107].

У захворюваності людей на сальмонельоз спостерігалось поступове зниження з 2005 року по 2013 [99–111]. Так само як і серед тварин, у структурі захворюваності людей стали переважати інші нетифоїдні серовари, а частка *Enteritidis* знизилась. Однак вже у 2017 році захворюваність зросла до 91662 випадків (порівняно з 82694 у 2013 році – найнижчий показник за останні 13 років), серед яких у 36,8 % інфекція була спричинена споживанням курячих яєць [109–111].

Отже, завдяки даним моніторингу виявлення сальмонел у харчовій продукції, серед свійської птиці та захворюваності людей на сальмонельоз, виявлено, що птахівництво та його продукція є основним джерелом бактерій

роду *Salmonella*. При цьому у серологічній структурі виявлених збудників переважають нетифоїдні сероварів: Enteritidis, Typhimurium, Infantis та інші.

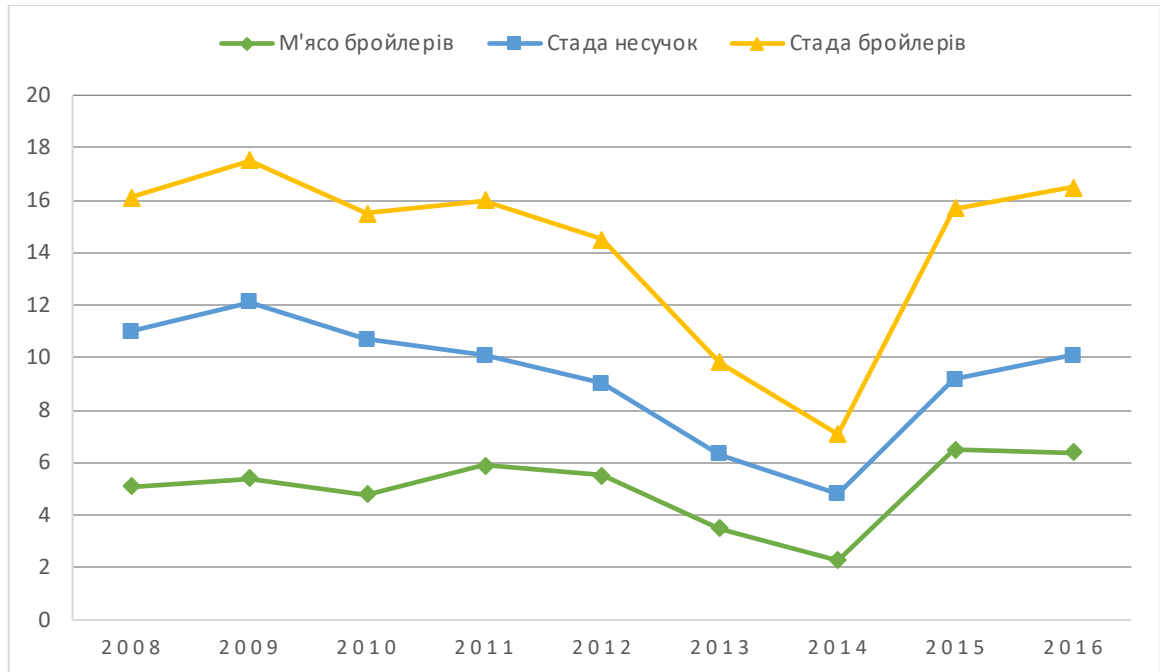


Рис 1.2. Динаміка поширеності сальмонел у стадах несучок та бройлерів, а також контамінації сирого м'яса бройлерів у країнах Європейського Союзу за результатами моніторингу протягом 2008–2016 років (дані European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control).

Варто зазначити, що у птиці сальмонельозна інфекція, викликана даними сероварами перебігає субклінічно, проте характерна зменшенням продуктивності. Основним фактором є трансваріальний шлях передачі збудника та зараження здорового поголів'я внаслідок споживання води і кормів, контамінованих сальмонелами від інфікованих особин стада. Зокрема, важливим є збільшення циркуляції сальмонел саме у стадах курей-несучок, яке у Європі спостерігається з 2014 року. Оскільки пропорційно цьому, збільшується кількість спалахів сальмонельозу у людей, викликаних споживанням столових яєць. З огляду на вищенаведені дані, пріоритетним завданням для науки та виробництва є зменшення циркуляції сальмонел серед свійської птиці, оскільки джерелом сальмонел найчастіше є контамінована

продукція галузі птахівництва. Основними кроками при цьому повинна бути оптимізація системи діагностики, яка полягає у впровадженні молекулярних методів, що дозволить прискорити процес ідентифікації та, в окремих випадках, дозволить відслідковувати джерело інфекції.

1.2. Біологічні властивості збудника

Сальмонела – грамнегативна бактерія з родини *Enterobacteriaceae*. Рід *Salmonella* включає два види *Salmonella enterica* та *Salmonella bongori*. До останнього виду входять 22 серовари [42]. В межах виду *Salmonella enterica* знаходяться 2557 сероварів, більшість з яких – 1531 – належать до підвиду *S. enterica subsp. enterica* [42]. Здебільшого збудниками інфекції у теплокровних є підвиди *enterica* та *salamae* виду *Salmonella enterica*, а ізоляти сероварів решти підвидів та виду *Salmonella bongori* виділяють від холоднокровних тварин та з об'єктів навколишнього середовища [112]. Однак в рідкісних випадках реєструють випадки захворювання людей, спричинені ізолятами виду *Salmonella bongori* [113]. Відмічається, що природнім резервуаром *Salmonella bongori* є дикі птахи [114]. Про випадки виділення сальмонел виду *S. bongori* повідомлялось у результатах досліджень м'яса птиці у 2010 [115]. Сальмонельоз може перебігати безсимптомно, або викликати гастроентерити [116–117]. Також сальмонельозна інфекція може призводити до зневоднення, септицемії, абортів [118–121].

Мікроскопічні дослідження описують сальмонели як прямі грамнегативні палички з округлими кінцями та розмірами $0,7 - 1,5 \times 2,0 - 5,0$ мкм, що здатні формувати колонії діаметром 2 – 4 мм [122]. Факультативні анаероби. Більшість сальмонел рухливі, окрім *Salmonella Gallinarum* (включно з їхніми біоварами *Gallinarum* та *Pullorum*) [123].

Метаболізм сальмонели характеризується здатністю відновлювати нітрати до нітритів. Реакція з уреазою та індолом негативні. У якості джерела карбону сальмонели використовують цитрат. Бактерії роду *Salmonella* не

ферментують сахарозу, саліцин, інозитол, амігдалін. Не продукують ліпазу та дезоксирибонуклеазу [122–123].

Шляхи передачі сальмонельозу: аліментарний, аерогенний, оваріальний [124–126]. Воротами інфекції є епітелій тонкого кишечника. За допомогою фімбрій та пілей сальмонела прикріплюється до стінок тонкого кишечника для подальшого розвитку інфекційного процесу [127].

1.2.1. Роль факторів патогенності у патогенезі захворювання

Патогенність бактерії залежить від наявності факторів патогенності. Серед них виділяють джгутики, пілі, токсини, патогенні острови (сукупність генів зі специфічною хромосомною локалізацією, що кодують фактори вірулентності) та вірулентні плазмідні [128–133]. Кожен з цих факторів відіграє роль на певному етапі інфекційного процесу. Джгутики забезпечують рухливість бактерії і розташовані перитрихіально [132]. Як правило, кожна клітина має від 5 до 10 джгутиків [134–135]. Дані елементи побудовані з білка флагеліну, який у сальмонел представлений двома фазами, що відображено у схемі Вайта-Кауффмана. Впродовж клітинного циклу присутній лише один білок: флагелін 1 фази або флагелін 2 фази [136–137].

Бактерії роду сальмонел здатні утворювати термостійкі токсичні речовини - ендотоксини, які являють собою гліцидо-ліпоїдно-поліпептидний комплекс та за певних умов токсини можуть накопичуватися у харчових продуктах [138]. До ендотоксинів традиційно відносять Ліпід А - компонент зовнішньої ліпополісахаридної мембрани клітинної стінки [139].

Екзотоксини поділяють на 3 основні групи: цитотоксини, сальмолізени та ентеротоксини [140]. Групу цитотоксинів також називають веротоксинами, оскільки їхню токсичність досліджували на лінії культур Vero [141–142]. У цих дослідках було доведено участь цитотоксинів як основних факторів патогенності у процесі інфікування організму-хазяїна. Із 25 штамми *Choleraesuis*, 94 *Enteritidis* та 12 *Typhi* було виявлено термолабільний трипсин-чутливий цитотоксин [143]. Однак цитотоксини, вироблені різними

сероварами, відрізнялися за молекулярною масою. Окрім того, кількість токсину може відрізнятися у окремих ізолятах одного серовару.

Shigella dysenteriae-1-like - цитотоксин, який продукують ізоляти сероварів Enteritidis, Karemba, Thompson. Цитотоксична дія нейтралізується антисироваткою до цього токсину [144]. Цитотоксини, чутливі до трипсину і протеази (однак не чутливі до папаїну) виявлені у сероварів Nchanga, Virchow [143].

Цитотоксин, що є компонентом зовнішньої мембрани виявлено у сероварів Block, Breanderup, Indiana, St. Paul, Typhimurium за температури 100° С протягом 15 хвилин руйнується лише частково [144]. У вищенаведених дослідках виділений та очищений ЛПС не викликав цитотоксичності. Натомість такий ефект викликали окремі фракції зовнішньої мембрани.

Термолабільний сальмонельозний ентеротоксин Stn - наявний у всіх сероварів виду *Salmonella enterica*, але відсутній у виду *Salmonella bongori* [145]. Даний токсин широко використовується у молекулярній діагностиці для видової ідентифікації *S. enterica*. На амінокислотному рівні гомологічний до субодиниць СТ-А та СТ-В холерного токсину, термолабільного токсину *E. coli* LT-1, екзотоксину А *Pseudomonas aeruginosa* та дифтерійного токсину [146–147].

Ключову роль у розвитку інфекційного процесу при потрапленні сальмонел в організм тварини відіграють «острови патогенності». Даним терміном описують хромосомні кластери генів, які кодують фактори патогенності. Острови патогенності також присутні у геномі *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus spp.*, *Riemerella anatipestifer*, *Francisella tularensis* [148–151]. Припускають, що гени вірулентності на цих ділянках - результат горизонтального переносу генів від інших бактерій, оскільки вміст у цих локусах гуаніну і цитозину значно відрізняється від решти геному сальмонел, а також включає сайти *attP* та *attB*, залучені у сайт-специфічній рекомбінації [152–153].

Острови патогенності являють собою сукупність генів транспортної РНК та генів, що кодують білки [154]. Окрім цього обов'язковим елементом даної генетичної структури є гени рекомбіназ та інтеграз, які фланкують *SPI* та забезпечують інтеграцію в хромосому [155]. На сьогодні відомо 24 острови патогенності [156]. Найповніше описано та охарактеризовано *SPI-1* та *SPI-2* [157–158] – сукупність генів, що кодують систему секреції білків 3 типу (*T3SS* – *Type 3 Secretion System*). Основною функцією генів *SPI-1* є інвазія клітин епітелію тонкого кишечника і транспорт бактеріальних білків у цитозоль клітини-хазяїна [159]. Даний процес здійснюється в результаті експресії генів *SPI-1* транскрипційними регуляторами і утворення специфічного білкового комплексу у вигляді голки, за допомогою якого здійснюється інвазія в нефагоцитуючі епітеліальні клітини тонкого кишечника [159]. До кластера *SPI-1* розміром 40 kb входять 39 генів, їхні шаперони, ефекторні білки та регулятори транскрипції. Основною функцією всіх елементів *SPI-1* є контроль імунної відповіді організму, перебудова актинового цитоскелету і транслокація інвазійних білків. Функціонування *SPI* регулюється каскадом транскрипційних регуляторів [160–162]. Центральним із них є *HilA*. Каскад послідовної індукції та зв'язування регуляторів створює умови для існування двох субпопуляцій сальмонели у кишечному тракті: інвазивних та неінвазивних.

За таким же принципом відбувається регуляція генів, що кодують джгутики. У роботі Naredo et al. [163] було продемонстровано пряму залежність експресії генів інвазійного механізму та джгутикових генів від компонентів середовища.

1.2.2. Генетична детермінація факторів патогенності

Генетичний матеріал у сальмонел закодований у вигляді подвійного ланцюга дезоксирибонуклеїнової кислоти на хромосомах. Додатковими генетичними елементами є плазмід, транспозони та інтегри [164–166]. Ген – це ділянка ДНК, локалізована на хромосомі або позахромосомних елементах,

що кодує білок [167]. Якщо білок представлений кількома поліпептидними ланцюгами, то ділянка, що кодує один ланцюг являє собою цистрон. У бактерій цистрони розташовані поряд один з одним [168].

Для експресії гену та синтезу білка необхідно забезпечення початкового етапу – синтезу РНК на матриці денатурованого ланцюга ДНК. Цей процес ініціюється зв'язуванням РНК-полімерази зі специфічною ділянкою ДНК. У бактерій цією ділянкою є промотор [169–170]. Особливістю структурної організації генетичного матеріалу у бактерій є об'єднання всіх функціональних відділів ДНК у специфічні функціональні одиниці – оперони. До складу оперону входять, як правило промотор, оператор та власне нуклеотидні послідовності генів [170]. Оператор – це ділянка ДНК, що зв'язується з білком-репресором, який пригнічує експресію гена [170].

Така організація генетичного матеріалу та відповідно регуляція експресії притаманні генам ферментів, які каталізують обмін речовин бактерій та генам вірулентності. В результаті стрімкого розвитку молекулярної біології та удосконалення методів секвенування, було виявлено значне число генів, що кодують фактори колонізації, адгезії, інвазії та ідентифіковано оперони, що містять в собі всі функціональні елементи, які забезпечують експресію генів та синтез білків, необхідних для кожного етапу інфекційного процесу [171–174].

Сальмонела потрапляє до організму ссавців аліментарним шляхом, внаслідок споживання контамінованих харчових продуктів. Вхідними воротами інфекції за сальмонельозу є слизова оболонка тонкого кишечника. За допомогою фімбрій та пілей сальмонела прикріплюється до стінок тонкого кишечника для подальшого проникнення в клітину. В цьому процесі задіяні дві системи секреції білків: *T3SS1 (type 3 secretion system* – система секреції білків 3 типу), до складу якої входять ефекторні білки, здатні до перебудови цитоскелету клітини, та *T3SS2*, що включає в себе ряд білків, необхідних для виживання збудника всередині клітини еукаріота [173–174]. Однак експресія генів ефекторних білків відбувається лише у відповідь на дію системи сигнальної трансдукції. У випадку початкових етапів інфекційного процесу

ідеться про гени ефекторних білків, що локалізуються на острівцях патогенності *SPI-1* та *SPI-2* (*Salmonella pathogenicity island*) [175].

У сальмонели є кілька систем, які активуються у відповідь на несприятливі умови такі як: висока осмолярність, кислотний або тепловий шок та дефіцит поживних речовин. В основі них лежить принцип двокомпонентної системи, в якій є сенсор, що сприймає цитоплазматичні сигнали, та регулятор. В якості останнього виступає ДНК-зв'язувальний білок, який активує транскрипцію генів патогенності [177]. Сенсор – гістидин-кіназа, яка фосфорилує регуляторний білок, таким чином активуючи його. Бактерії з мутаціями в генах сенсорних кіназ не мають механізму фосфорилування і регуляторний білок в системі толерантності є неактивним. Такі штами чутливі до високих значень рН та швидко гинуть [177].

Ще одним фактором, який здатний запобігати проліферації збудника в організмі людини або тварини є дія неспецифічного імунітету. Клітини, здатні до фагоцитозу - нейтрофіли, макрофаги та епітеліоцити слизової оболонки - здійснюють механічне захоплення клітин бактерії у фагосоми, де створює кисле середовище з метою нейтралізації або ліквідації збудника [180–181]. Хоча кисле середовище не є токсичним, але створює оптимальні умови для активності гідролітичних ферментів та утворення пероксиду [182–186]. Наявність у сальмонели системи сигнальної трансдукції *EnvZ/OmpR*, яка призводить до відповідного закислення її власної цитоплазми, дозволяє уникнути фагоцитозу.

Інфікування організму ссавців сальмонелами супроводжується утворенням специфічних вакуоль *SCV* (*Salmonella-containing vacuole* – вакуолі, що містять сальмонелу) в цитоплазмі еукаріотичної клітини [187]. *SCV* – це модифікована фагосома, яка утворюється в результаті перебудови цитоскелету клітини. При цьому, як правило, мішенню є клітини, здатні до фагоцитозу: нейтрофіли, макрофаги та епітеліоцити слизової оболонки тонкого кишечника – М-клітини [188].

З огляду на специфічний механізм інфікування, сальмонелу вважають факультативним внутрішньоклітинним патогеном. Перебудовуючи цитоскелет еукаріотичної клітини за допомогою ряду ефекторних білків, вона проникає в клітину у вигляді вакуолі SCV, де продовже свою персистенцію.

На сьогодні відомо, що толерантність до високого осмотичного тиску досягається завдяки функціонування системи *EnvZ/OmpR*, яка також регулює експресію оперона *ssrAB*, який локалізується на островці патогенності *SPI-2* (*Salmonella pathogenicity island*) та запускає експресію ефекторних білків, які виступають факторами патогенності. Оперон *ssrAB* також регулюється двокомпонентною системою протидії кислотному шоку *PhoP/PhoQ* [189]. Функціонування системи *PhoP/PhoQ* безпосередньо залежить від сигма-фактору *RpoS*, накопичення якого відбувається за умов низьких концентрацій катіонів магнію [190].

Система стійкості до осмотичного тиску *EnvZ/OmpR* побудована за принципом взаємодії сенсора та регулятора. Білок *EnvZ* є сенсорною кіназою, яка активується у відповідь на підвищення осмотичного тиску у внутрішньоклітинному просторі та здійснює фосфорилювання ДНК-зв'язуючого білка *OmpR*. Останній регулює експресію ряду генів, що кодують АТФ-синтазу у сальмонели. Ці гени локалізуються на островці патогенності *SPI-2* (*Salmonella pathogenicity island 2*). Внаслідок цього утворюється протонний градієнт, який дозволяє окислювати цитоплазму бактерії, а потім і вакуолі SCV. Це є важливим захисним механізмом, що попереджає знищення бактерії макрофагами. Оскільки після ізолювання бактерії, макрофаги створюють кисле середовище всередині внутрішньоклітинних компартментів [191–192].

Також є дані про те, що система *EnvZ/OmpR* регулює утворення капсульного Vi-антигену у тифоїдного серовара *S. Typhi*. Регулятор *OmpR* разом із РНК-зв'язувальним фактором *Hfq* координує процес транскрипції генів Vi-антигену [193]. Цей процес відбувається шляхом взаємодії *OmpR* із промотором гену *tviA* (активатор Vi-антигену на локусі *viaB* у серовару *S.*

Typhі), що призводить до активації транскрипції останнього і таким чином активує капсулярний антиген. За результатами досліджень [194], в яких штам *S. Typhі* культивували в умовах високої та низької осмолярності, у клітинах, які піддавалися осмотичному стресу, спостерігали високий рівень мРНК *OmpR*.

Результати досліджень нетифоїдних сероварів - *S. Typhimurium* - показали, що *OmpR* є білком кислотного шоку та регулюється на рівні транскрипції [195–196]. Важливим фактом також є те, що за відсутності етапу фосфорилювання сенсорною кіназою *EnvZ*, *OmpR* не може впливати на експресію генів, що кодують порини зовнішньої мембрани *OmpC* та *OmpF*.

В ході дослідження трансдукції між компонентами *EnvZ/OmpR* стало зрозумілим, що сальмонела отримує сигнали із цитоплазматичного простору, а сенсорні молекули знаходяться на внутрішній мембрані [197–198].

Здатність виживати в умовах кислотного шоку забезпечується системою *PhoP/PhoQ*, яка також функціонує за принципом сигнальної трансдукції. *PhoQ* є сигнальним сенсором гістидин кінази. Сигналами, як правило, є кисле рН, двовалентні катіони та позивно заряджені антимікробні пептиди [199]. Відбувається фосфорилювання залишку гістидину і перенесення фосфатної групи до регулятора *PhoP*. Сенсорні домени білку *PhoQ* розташовані у периплазмі, тоді як сам білок знаходиться на внутрішній мембрані. За підвищення рН, задіюється також і цитоплазматичний домен [200].

Також в активації *PhoQ* задіяні додаткові білки, які відрізняються у різних видів в межах родини *Enterobacteriaceae*. Так, у сальмонел є мембранний білок UgtL, експресію якого забезпечує система *PhoP\PhoQ*. [201–202] Подібний до білку *SafA*, який є присутній у *E. Coli* та *Shigella*, який на пряму взаємодіє з периплазматичною ділянкою *PhoQ* та активується за умов кислого рН.

Важливою функцією двокомпонентної системи *PhoP\PhoQ* є контроль експресії генів *spv\ssa* в середовищі макрофагів [203]. Останні є основною складовою частиною системи секреції білків 3 типу *T3SS (type III secretion*

systems) та синтезуються лише за умов перебування сальмонели всередині еукаріотичної клітини. [204]. Також варто сказати, що їхня експресія залежить від *SsrB/SpiR* і обидві ці системи локалізуються на острівці патогенності *SPI-2*. Таким чином, *PhoP\PhoQ* контролює експресію *spi\ssa* у макрофагах через регуляцію *SsrB/SpiR* [205–206]

Основним регулятором систем сигнальної трансдукції *PhoP/PhoQ* та *EnvZ/OmpR* є альтернативний сигма-фактор, субодиниця бактеріальної РНК-полімерази – *RpoS*, який функціонує під час стаціонарної фази та, зокрема, в умовах зниженої кислотності, високого осмотичного тиску, теплового шоку та за дефіциту поживних речовин [207–208]. В РНК полімерази ентеробактерій виділяють основний білок σ та сім асоційованих із ним субодиниць, з якими він формує голоензим. Одна із цих субодиниць (σ або *RpoS* - кодується однойменним геном *RpoS*) здійснює регуляцію транскрипції генів за експоненціальної фази. Однак за стаціонарної фази відбувається накопичення білку *RpoS* в клітині за несприятливих умов (дефіцит Mg^{2+} , низькі значення рН, високий осмотичний тиск) [209].

Необхідність катіонів магнію зумовлена їхньою здатністю виступати кофакторами у більшості ферментних перетворень. Накопичення магнію відбувається здебільшого під час експоненціальної, або логарифмічної, фази розмноження збудника в організмі хазяїна. Під час цієї фази відбувається активний поділ клітин.

Регуляцію транспорту Mg^{2+} також здійснюють фактори *MgtA* та *MgtB* [210–213]. Ще один фактор, який виконує функцію перенесення магнію - *CorA* – двовалентний катіонний канал, однак його транскрипція не залежить від концентрації в клітині [214–216].

У випадку дефіциту Магнію у стаціонарній фазі росту, відбувається накопичення сигма-фактору, який запускає реплікацію системи *PhoP\PhoQ*, яка також є захисним механізмом в умовах низьких значень рН, високого осмотичного тиску, дефіциту поживних речовин.

PhoP/PhoQ знаходяться під регуляцією *RpoS* забезпечує стійкість до неорганічних кислот [217]. Окрім цього, система *PhoP/PhoQ* керує адаптацією до дефіциту катіонів магнію Mg^{2+} та дії макрофагів. Вивчення генів, що кодують систему, та виявлення в них мутацій дозволило зробити висновки про те, що за їх наявності, або інактивації одного з факторів, бактерії володіють значно зниженою вірулентністю та чутливістю до кислого середовища [218].

За умов стресу відбувається швидке накопичення *RpoS*, що є каталізатором експресії ряду *RpoS*-залежних білків, які виконують захисну функцію в умовах кислотного стресу. Стабільність сигма-фактора знаходиться у прямій залежності від протеази ClpXP, а деградація – від білку RssB. У сальмонел цей білок кодується геном *mviA* [219–221].

Очевидно, що *RssB* має тенденцію до зв'язування з *RpoS*. Однак збільшення рівня останнього відбувається шляхом зв'язування *iraP* з *RssB* [220]. В той же час транскрипція *iraP* активується системою *PhoP/PhoQ* в умовах нестачі катіонів магнію Mg^{2+} [222].

1.2.2.1. Гени резистентності до антибактеріальних препаратів

Питання виникнення антибіотикорезистентності розглядається не тільки в аспекті причинно-наслідкових зв'язків, але і в аспекті механізмів виникнення. Одним із пояснень виникнення резистентності до антибактеріальних препаратів вважають накопичення точкових мутацій та наступна модифікація генів або ж явище горизонтального перенесення генів [223]. Обидва ці процеси присутні у бактерій і є результатом набутої антибіотикорезистентності. Відрізняються лише механізми набуття таких генетичних детермінант, їхня локалізація та функціонування.

В окремих випадках гени антибіотикорезистентності містяться у складі хромосом. Проте найчастіше вони локалізуються на позахромосомних генетичних елементах: кон'югативних плазмідах, транспозонах та у складі інтегронів. Всі ці структури пов'язані між собою, оскільки інтегрони є не

самостійним мобільним елементом, а скоріше вектором для розповсюдження генів антибіотикорезистентності у складі транспозонів та плазмід. По суті інтегриони – це природні самостійні системи сайт-специфічної рекомбінації [224]. Інтегриони є місцем вбудовування генетичних детермінант резистентності та входять до складу транспозонів, плазмід та специфічних інсерційних елементів [225].

Інтегрон завжди містить три складових: ген ферменту інтегрази *intI*, який розрізає ланцюг ДНК, первинний сайт рекомбінації *attI* та промотор, який ініціює транскрипцію [226–227]. На основі аналізу амінокислотних послідовностей інтегрази, яка каталізує рекомбінацію між сайтами *attI* інтегрона та *aacC* генної касети, було побудовано класифікацію інтегронів на 5 класів [228–230]. Інтегриони 1, 2, 3 класів, що мають у своєму складі гени інтегрази *intI1*, *intI2* та *intI3* відповідно, локалізуються на плазмідах та циркулюють переважно серед ентеробактерій. Інтегриони 1 і 2 класів асоційовані із мультирезистентними штамми. Інтегрон 4 класу з геном *intI4* вперше був ідентифікований як інтегрон із хромосомною локалізацією і є специфічним для *Vibrio cholerae* [231]. Структура інтегрону спрямована на приєднання послідовностей генів, які транскрибуються у їхньому складі. Сайт рекомбінації *attC* вбудовується в інтегрон внаслідок того, що є асоційованим із відкритою рамкою зчитування і разом з нею у вільному стані існує у вигляді циркулярної молекули. Транскрипція цієї структури можлива, у більшості випадків, лише у складі інтегрону. Детальне вивчення та секвенування цих структур дозволило ідентифікувати їх як детермінанти антимікробної резистентності.

Детальне вивчення цих детермінант почалося з ряду дослідів, які виявили однакову локалізацію генів резистентності до триметоприму та сульфаніламідів методом побудови рестрикційних карт і гетеродуплексного аналізу плазмід групи *Inc-W*, що входять до складу *Escherichia coli* [232]. Таку ж локалізацію генів резистентності виявили при дослідженні генів антибіотикорезистентності у складі транспозонів та плазмід групи *Inc-N* [233].

Окрім цього у дослідженні було виявлено, що гени резистентності до триметоприму, оксацикліну та аміноглікозидів фланковано послідовністю із 59 основ. Елемент із 59 основ розташований на 3'-кінці гена резистентності і є сайтом-рестрикції *attC* [234].

Як уже було зазначено вище, генні касети не мають власного промотора, тому транскрибуються з промотора, що міститься у складі інтегрона. Є лише кілька винятків - касети *cmlA* та *qacE*, що містять промотор [235–238]. Касета *cmlA* містить ген білку *CmlA*, який здійснює активний еффлюкс хлорамфеніколу з клітини. *CmlA* широко розповсюджена серед резистентних до хлорамфеніколу ентеробактерій у складі інтегронів 1 класу [239–241]. Касета *qacE* забезпечує еффлюкс четвертинних структур амонію з бактеріальної клітини. Генні касети класифікують відповідно до класу ферментів, які вони кодують. Резистентність до бета-лактамаз забезпечується бета-лактамазами класів A, B, C і D [235–236].

У ретроспективному аналізі ізолятів *Salmonella enterica*, виділених від продуктивних тварин протягом 1998–2011 років Mcmillan et al [242] було виявлено генні касети резистентності до аміноглікозидів (*aadA1a*, *aadA1bs*, *aadb*, *aadA2*, *aadA7*, *aadA6D2*, *aadA1bx*, *aadA12*, *aadA7g*, *aadA16c*, *aadA1D13*), бета-лактамінів (*bla_{CARB-2}*, *bla_{CARB-3}*), хлорамфеніколу (*cmlA1g*), триметоприму (*drfA1*, *drfA12*, *drfA14b*) та кілька генних касет, функція яких не визначена.

На основі відкритих біоінформатичних баз даних створено систему, яка акумулює всі дані щодо уже відомих і описаних в літературі інтегронів та генних касет – INTEGRALL [243].

Оскільки генні касети приєднуються до інтегрона на сайті *attI* в орієнтації 5' з кінця консервативної ділянки 5 CS, то рівень їх експресії залежить від локалізації. Генні касети, що розміщені ближче до оперона мають вищий рівень експресії і навпаки.

Інтегрони можуть містити одночасно кілька касет, які називають злитими, або тандемними [244]. Кожна генна касета містить один ген, фланкований сайтом рекомбінації, а при повній або частковій делеції

останнього, вона може зливатися з іншими касетами, що розміщені в межах одного інтегрону. Прикладом цього є злиття касет *aadA1* і *oxa9*, які несуть гени резистентності до бета-лактамів та аміноглікозидів. У цьому випадку 3'-кінець гену резистентності до аміноглікозидів фланкований вкороченою послідовністю із 14 пар основ, а 59-основний сайт рекомбінації локалізований у напрямку 3' послідовно за геном *oxa9* [245–246].

Касети завжди локалізовані у напрямку від 5'-кінця і розміщені за геном *int11*, який кодує фермент ДНК-інтегразу. У інтегронах 1 класу, який є найпоширенішим серед клінічних ізолятів сальмонели, із 3'-кінця розміщений ген резистентності до сульфаніламідів *sul1* [246].

Процеси інсерції та ексцизії генних касет відбуваються у процесі сайт-специфічної рекомбінації за участі сайтів інтегрону *attI* та специфічного елементу у складі інтегрону, що складається із 59-основ.

Генні касети завжди локалізовані на інтегронах. У випадку рекомбінації за участі вторинних сайтів та у присутності продукту експресії *intl* генні касети можуть локалізуватися на неспецифічних сайтах. Прикладом цього є ген *dfrA6*, який кодує ферменти дигідрофолатредуктази класу А, що фенотипово проявляється резистентністю до триметоприму [246–247].

Касети, утворені злиттям кількох генів виявляли у дослідженні резистентних ізолятів сальмонели та кампілобактерій. Зокрема було виявлено інтегрон 1 класу, який містив касету з генами резистентності до триметоприму та до аміноглікозидів *dfrA1-aadA1a* [248].

При дослідженні клінічних ізолятів Enterobacteriaceae Інтегрони 1 і 2 класу були виявлені у 36 % і 4 % ізолятів відповідно. При цьому у ізолятів було виявлена висока резистентність до ампіциліну, стрептоміцину, тетрацикліну, триметоприму і сульфафуразолу.

Є багато доказів щодо того, що у випадку зменшення або припинення використання певного препарату, гени резистентності до нього не втрачаються, а залишаються у складі генних касет в інтегронах. Найресповсюдженішими генними касетами є ті, що містять гени

резистентності до стрептоміцину та спектиноміцину: *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*. Ці два препарати досить рідко використовуються при лікуванні захворювань, спричинених ентеробактеріями і не входять до терапії першої лінії.

1.2.2.2. Гени помірних бактеріофагів

Помірні, або літичні, бактеріофаги – віруси мікроорганізмів, які потрапляючи в геном бактерії, змінюють її фенотипові властивості, або ж, привносять гени, що посилюють інвазивні та патогенні властивості. Ключовим для інвазії та виживання для сальмонел всередині клітин є бактеріальна система секреції білків 3 типу T3SS1. Вона фактично є механізмом для транслокації білкових факторів патогенності із бактеріальної цитоплазми у цитоплазму клітини хазяїна і складається із не менше, ніж 20 білків. Вважають, що T3SS1 з'явилась у геномі сальмонел внаслідок інфікування останньої бактеріофагами [249]. Так, ген *soxE*, джерелом якого є профаг *soxEφ* кодує однойменний білок, який взаємодіє з актиновим цитоскелетом, спричиняючи його перебудову. За втрати цього гену сальмонели можуть значною мірою зменшувати свою інвазивність.

Серед помірних фагів, у сальмонел найчастіше зустрічаються профаги родини *Siphoviridae* (*Gifsy-1*, *Gifsy-2*). Обидва фаги здатні до індукції за дії УФ-випромінювання та Мітоміцину C [250]. *Gifsy-1* вносить до геному бактерії потенційні гени вірулентності, основним з яких є *gipA*. Експресія цього гену впливає на колонізацію тонкого кишечника сальмонелами, а його делеція призводить до значної втрати вірулентності бактерії [251]. Такий значний вплив на вірулентність пояснюється тим, що бактерії з наявним геном *gipA* мають здатність персистувати у Пейєрових бляшках [252]. Схожий вплив на вірулентність лізогенізованих бактерій має профаг *Gifsy-2*, який є носієм гену *sodC1*. Останній, експресуючи супероксиддисмутаза, є фактором патогенності та підвищує вірулентність штамів у п'ять разів [253].

1.3. Лабораторна діагностика сальмонельозу птиці

Виділення чистої культури – еталонний метод діагностики бактеріальних інфекцій, який є основним, хоча і може доповнюватися імунологічними та молекулярно біологічними методами [254]. Початкові етапи бактеріологічної діагностики сальмонельозу завжди включають попереднє збагачення дослідного зразку на забуференій пептонній воді та селективне збагачення на середовищах, що пригнічують ріст бактерій *Proteus spp.* і грампозитивної мікрофлори [255]. Після цього дослідні зразки культивують на селективних і диференційних хромогенних середовищах з наступним підтвердженням роду *Salmonella* та визначенням серовару у реакції аглютинації за схемою Вайта-Кауфмана [256]. Однак у бактеріологічного методу є свої недоліки:

- 1) значна тривалість у часі. Кожен етап – преселективне збагачення, селективне накопичення та диференціація – займають у середньому близько 18 годин [257];
- 2) трудоемкість. Метод вимагає використання великої кількості посуду, середовищ та потребує тривалої роботи фахівців-мікробіологів;
- 3) необхідність високої концентрації збудника, оскільки за його невеликої кількості у відібраному зразку не завжди вдається виділити культуру, що призводить до хибно негативних результатів [258].

З розвитком молекулярної біології значного поширення у діагностиці та впровадження у рутинну практику набув метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Він полягає у виявленні специфічної ділянки ДНК збудника за допомогою цього методу [259]. За допомогою ПЛР можливо виявити генетичний матеріал збудника у низьких концентраціях, особливо це стосується модифікації ПЛР у реальному часі, яка крім ідентифікації дозволяє провести кількісний аналіз [260]. По-друге, застосування ПЛР-РЧ значно скорочує час дослідження і дозволяє отримати результати вже у день відбору зразка.

На сьогодні існує кілька модифікацій полімеразної ланцюгової реакції, кожна з яких має свою сферу використання [261]. Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі широко застосовується в діагностиці, оскільки має вищу специфічність та чутливість, ніж класичний варіант із візуалізацією ампліконів у агарозному гелі [262]. Окрім олігонуклеотидних праймерів, які фланкують ділянку ампліфікації для кратного накопичення продукту в ПЛР-РЧ використовується зонд із флуоресцентним барвником на 5'-кінці та відповідним йому гасником на 3'-кінці нуклеотидної послідовності. Облік накопичення продукту реакції відбувається в результаті зчитування сигналу ампліфікатором, який генерується при відділенні флуорофора і гасника під дією Taq-полімерази. Цей процес відбувається у кожному циклі. Сигнал збільшується пропорційно до кількості ампліфікованого ДНК.

ПЛР-РЧ може використовуватися як для детекції однієї мішені, так і для мультиплексних реакцій [263]. Так, наприклад, у ПЛР-РЧ можна одночасно підтвердити належність бактерії до роду *Salmonella* та диференціювати її відповідно до серовару – Enteritidis та Typhimurium. Тобто використання цього методу дозволяє одночасно виявляти збудник сальмонельозу та ідентифікувати найбільш розповсюджені серовари, які є небезпечними для людини та найбільш поширені серед поголів'я тваринницьких господарств.

Вищенаведені переваги методу ПЛР сприяють його дедалі більшому впровадження в практику лабораторної діагностики у якості методу для підтвердження результатів бактеріологічних досліджень.

1.4. Заключення з огляду літератури

Аналіз фахових літературних джерел засвідчує суттєву проблему сальмонельозу як з позицій проблем галузі тваринництва, так і з позицій зоонозу, що є надзвичайно важливим в забезпеченні здоров'я людей. При цьому дискусійними і проблемними залишаються питання щодо мінливості сальмонел, пов'язаних з факторами патогенності та

антибіотикорезистентності. Постійна циркуляція бактерій у природному середовищі призводить до набуття ними нових генів з плазмідною локалізацією, що підвищують патогенність. Ще одним важливим джерелом генетичної мінливості є помірні бактеріофаги, які інфікуючи бактерії, вбудовуються в геном, привносячи нові гени факторів патогенності. Зокрема нами проаналізовано літературні джерела, які описують у високопатогенних сальмонел гени колонізації, отримані від помірних бактеріофагів.

Зростання антибіотикорезистентності у збудників бактеріальних інфекцій спричинена локалізацією генів, що кодують резистентність до антибактеріальних препаратів різних класів на мобільних генетичних елементах., зокрема – на інтегронах. Останні мають здатність накопичувати гени у великій кількості та переносити як в середині популяції сальмонел так і між різними видами ентеробактерій. Інтегрони локалізуються здебільшого на плазмідах, які є позахромосомним генетичним матеріалом. Одна із декількох класифікацій плазмід базується на відмінності типів реплікації. Одночасно у клітині можуть міститись плазмід з різним типом реплікації. З декількох плазмід, що мають однаковий тип реплікації, впродовж кількох клітинних циклів, залишаться копії лише однієї плазмід, решта – елімінуються.

Таким чином, дослідження набору генів факторів патогенності та антибіотикорезистентності, а також наявності у сальмонел плазмід різних типів є необхідним для поглиблення розуміння патогенезу, що у свою чергу дає можливість для покращення та оптимізації контролю над збудником.

РОЗДІЛ 2

ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Робота виконувалась протягом 2014 – 2020 років у відділі молекулярної біології та імунохімії (завідувач відділу Дерябін О. М.), а також у відділі бактеріологічних досліджень та контролю якості ветеринарних імунобіологічних засобів (завідувач відділу – кандидат ветеринарних наук Пінчук Н. Г.) Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Матеріалом для дослідження були 57 ізолятів роду *Salmonella*, що надходили із регіональних лабораторій ветеринарної медицини, а також ізоляти, виділені зі змивів, взятих на території птахогосподарств. Поряд із цим об'єктом дослідження також були штами роду *Salmonella*, що належать Національному центру штамів НЦШМ Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Факторами патогенності у сальмонел є білки, токсини, ферменти та інші специфічні речовини, що забезпечують колонізацію, адгезію, інвазію та механізми протидії фагоцитозу в клітинах хазяїна [128]. Гени, що їх кодують локалізуються на хромосомах або на великих плазмідах. Як правило, гени вірулентності взаємодіють між собою і мають взаємну регуляцію. Проте, як відомо [264], геном бактерій є дуже мінливим, тому сальмонели можуть як набувати нові гени вірулентності, так і втрачати їх. Це, відповідно, може бути причиною зниження патогенності або, навпаки, призводити до появи нових високопатогенних популяцій. Набуття генів вірулентності також спричинюється постійною циркуляцією бактерій у навколишньому середовищі. В цьому разі позахромосомні спадкові елементи передаються шляхом так званого горизонтального переносу генів [223]. Ще одним джерелом отримання нових генів, а отже, і нових властивостей є інфікування бактеріофагами. Бактеріофаги – це віруси мікроорганізмів, які існують у двох основних формах: літичній та помірній [265]. Принципова різниця між ними

полягає у тому, що помірні фаги здатні, залежно від умов, лізувати бактерію або ж вбудовуватися в її геном і змінювати її фенотипові властивості [266]. Найчастіший результат інфікування бактерій помірними фагами – внесення в геном бактерії генів, що посилюють інвазивні та патогенні властивості [267]. На етапі колонізації важливими є включення механізмів, що дозволяють уникнути дії неспецифічного імунітету еукаріотичного організму – тварини, птиці або людини; а також дії фізіологічних факторів: жовчних солей та соляної кислоти. У сальмонел основними є двокомпонентні системи сигнальної трансдукції *EnvZ/OmpR* та *PhoP/PhoQ* [268]. Однак важливу роль у колонізації відіграють окремі гени, джерелом яких є горизонтальне перенесення генів або інфікування бактерії вірусами – помірними бактеріофагами. Нами було відібрано два гени, які є елементами помірних бактеріофагів та кодують у сальмонел фактори резистентності до дії супероксиду та уникнення фагоцитозу: *gipA* (помірний бактеріофаг *Gifsy-2*) та *sodCI* (помірний бактеріофаг *Gifsy-1*) [269]. Експресія цих генів робить можливою персистенцію сальмонел в Пейєрових пляшках та колонізацію тонкого кишечника. Окрім цього, в науковій літературі описано результати досліджень, які свідчать про багатократне підвищення вірулентності штамів, в яких були наявні дані гени [252].

Для детекції гену інвазії було обрано ген *invA*, оскільки він є спільним для роду *Salmonella* та є ключовим в системі секреції білків 3 типу – T3SS1, яка забезпечує процес перебудови цитоскелету клітин епітелію тонкого кишечника та утворення SCV – сальмонеловмісних вакуоль [270]. Також ген *invA* було використано для молекулярно-генетичного підтвердження належності дослідних ізолятів до роду *Salmonella*.

У сальмонел наявні декілька типів адгезивних білків, полімери яких формують пілі – ворсинки, що прикріплюються до клітинної стінки епітеліальних клітин [271]. Для детекції генів факторів адгезії нами було обрано ген *agfB*, який є спільним для виду *Salmonella enterica* та формує тонкі агрегативні фімбрії [272]. Також одним із таргетних генів стали *sefA* – ген, специфічний для Enteritidis та *sopE* – ген помірної бактеріофагу [269–273]. У якості гена, що кодує ендотоксини було обрано ген компоненту бактеріальної

клітинної стінки – *prt*. Ген кодує фермент паратозосинтазу, специфічний для сальмонел, що відносять до групи D [274]. До неї входять серовари *Enteritidis*, *Dublin*, *Gallinarum* [45].

Для детекції генів антибіотикорезистентності нами було обрано ген *tetG*, що кодує резистентність до тетрацикліну, *sulI* – ген резистентності до сульфаніламідів та *In104* – інтегрон – мобільний генетичний елемент [275]. Гени резистентності не можуть функціонувати самостійно, оскільки не мають необхідних для цього механізмів реплікації [276]. Останні наявні у складі інтегронів, відповідно – інтегрон є функціональним елементом, який накопичує гени резистентності. Таргетною ділянкою для детекції інтегрону *In104* у ізолятів та музейних штамів обрали послідовність, яка є місцем вбудовування генів [277].

Основним місцем локалізації інтегронів та вбудованих у їхню послідовність генів резистентності є плазмиди [278–279]. У зв'язку з тим, що в геномі сальмонел може бути наявні одразу декілька різних плазмід дослідженні проводили детекцію репліконів плазмід трьох типів несумісності. Існує декілька способів класифікації плазмід: за розміром, функцією та типом реплікації [280–282]. Встановлено, що одночасно в геномі можуть міститися декілька плазмід тільки якщо вони мають різні типи реплікації [170]. Плазмиди з однаковим типом реплікації відносять до однієї групи несумісності. Тобто плазмиди, що мають однаковий тип реплікації не можуть міститись в геномі одного штаму. З огляду на це, ми провели детекцію трьох типів несумісності: *IncN*, *IncFIA*, *IncFIIA* [283].

Початковим етапом було отримання чистих бактеріальних культур на чашках Петрі з подальшим відбором одиничних колоній для підтвердження приналежності бактерій до роду *Salmonella* методом серологічного типування в реакції аглютинації за схемою Вайта-Кауфмана. Для бактерій, що реагували позитивно, визначали серовар за аналогічною схемою.

Для усіх досліджуваних культур визначали чутливість до антибактеріальних речовин методом диск-дифузії [284] з використанням в якості еталонної референс-культури штам *E. coli* ATCC 25922-F

Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Наступні етапи дослідження проводили у відділі Молекулярної біології та імунохімії. З цією метою штами та ізоляти культивували протягом 18 годин на м'ясо-пептонному бульйоні з подальшим пересівом на чашки із твердим середовищем МПА (м'ясо-пептонний агар). Через 24 години окремо відбирали одиничні колонії кожної культури та переносили у пробірки з лізуючим розчином для проведення молекулярно-біологічних досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції. Всі етапи проведених досліджень відображено на рис. 2.1.

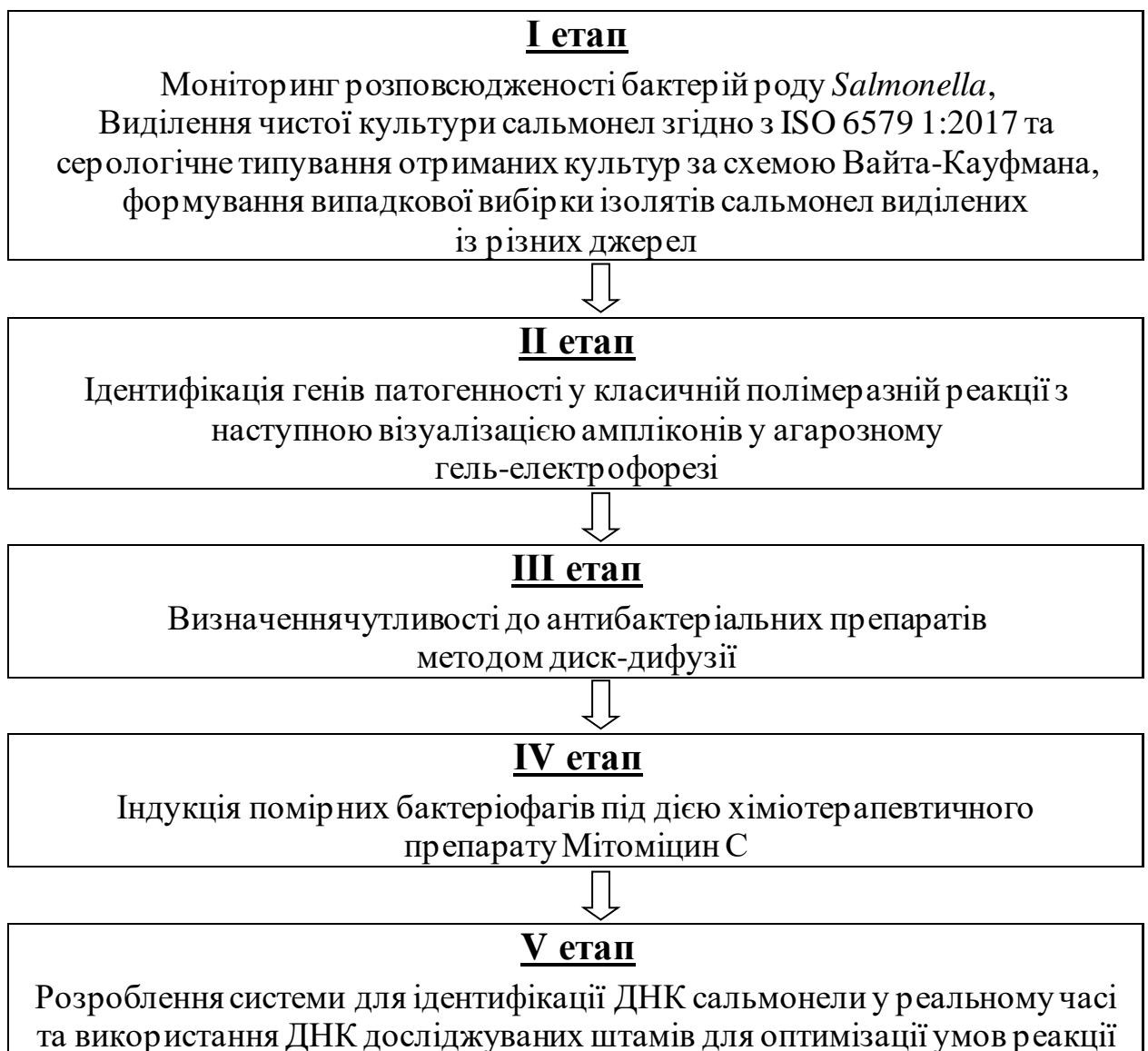


Рис. 2.1. Етапи проведених досліджень.

2.1. Виділення чистих культур ізолятів сальмонели

Виділення чистих культур сальмонели проводили згідно з ISO 5679 1:2017. В умовах птахогосподарств 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 19.09.2016 №310). Зразки висівали на забуферену пептонну воду (Himedia, Індія) та витримували протягом 24 годин із наступним перенесенням на селенітовий бульйон (Himedia, Індія) та на середовище Раппапорта-Василіадіса (Himedia, Індія). На даних середовищах проводили культивування протягом 18 годин за температури 42 ± 2 градуси. Після цього проводили посів штрихом на тверді селективні середовища: XLD (Xylose-Lysine Deoxycholate Agar, Himedia, Індія) та диференційне (RajHans Medium, Himedia, Індія). Колонії із типовим для сальмонели ростом відбирали для підтвердження роду у реакції аглютинації на склі із полі- та моновалентними сироватками (Sifin, Франція). Чисті живі культури сальмонел, що були виділені в регіональних лабораторій ветеринарної медицини, надходили у скляних пробірках зі скошеним агаром. Культури висівали на чашки з м'ясо-пептонним агаром МПА для подальшого серотипування в реакції аглютинації на склі. Штами сальмонели, що зберігаються, в Національному центрі штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів отримували в ліофілізованому стані та висівали на м'ясо-пептонний бульйон МПБ з наступним перенесенням на тверде поживне середовище МПА. Окремі колонії відбирали для подальших досліджень.

Штами НЦШМ, що використовувалися в дослідженнях: *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. Pullorum* K, *S. Pullorum* Ставропольський, *S. Pullorum* Петелінський, *S. Pullorum* 941, *S. Choleraesuis* 9, *S. Choleraesuis* 370, *S. Choleraesuis* TC-177, *S. Dublin* 373, *S. Dublin* K.

2.2. Проведення серологічної типізації ізолятів сальмонели

Визначення серовару проводили в реакції аглютинації (РА) на склі [45]. Спочатку проводили РА з омнівалентною сироваткою. Позитивна реакція свідчить про приналежність бактерії до роду *Salmonella*. Для культур, що позитивно реагували з омнівалентною сироваткою визначали О-антиген. З цією метою відбирали частину біомаси з пробірки із добовою культурою бактерії та змішували на склі з краплею відповідного антигену. Для визначення Н-антигену культуру висівали на бульйон. Через 18 годин культуру в бульйоні наносили точково на чашку із МПА.

Отримані результати використовували для встановлення антигенної формули та серовара за схемою Вайта-Кауффмана [45]. В результаті було сформовано підбірку ізолятів роду *Salmonella* із розподілом за областями циркуляції. Всього у дослідженні використано 22 ізоляти *Salmonella* Enteritidis (таблиця 2.1), 14 *Salmonella* Typhimurium (таблиця 2.2), 6 *Salmonella* Gallinarum (таблиця 2.3), 4 ізоляти *Salmonella* Infantis (таблиця 2.3), 3 ізоляти *Salmonella* Virchow (таблиця 2.3), 2 ізоляти *Salmonella* Heidelberg (таблиця 2.3), 1 ізолят *Salmonella* Dublin, 1 ізолят *Salmonella* Hadar, та 4 не типованих (*Salmonella enterica* spp.) ізоляти (таблиця 2.3).

Таблиця 2.1

Ізоляти *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis, використані у дослідженнях

№	Ізолят	Географічне походження (Область)	№	Ізолят	Географічне походження (Область)
1	S. Enteritidis DN1	Дніпропетровська	12	S. Enteritidis 6PR	Запорізька
2	S. Enteritidis DN3	Дніпропетровська	13	S. Enteritidis 4v	Житомирська
3	S. Enteritidis N6	Київська	14	S. Enteritidis S0822	Житомирська
4	S. Enteritidis 2679	Київська	15	S. Enteritidis L2	Харківська
5	S. Enteritidis GT	Київська	16	S. Enteritidis S1	Харківська

Таблиця 2.1 Продовження

№	Ізолят	Географічне походження (Область)	№	Ізолят	Географічне походження (Область)
6	<i>S. Enteritidis</i> 9	Київська	17	<i>S. Enteritidis</i> T16	Миколаївська
7	<i>S. Enteritidis</i> 15	Черкаська	18	<i>S. Enteritidis</i> PN	Полтавська
8	<i>S. Enteritidis</i> G22	Одеська	19	<i>S. Enteritidis</i> P18	Полтавська
9	<i>S. Enteritidis</i> 10	Одеська	20	<i>S. Enteritidis</i> 4	Львівська
10	<i>S. Enteritidis</i> K13	Запорізька	21	<i>S. Enteritidis</i> PgA2	Львівська
11	<i>S. Enteritidis</i> P81	Запорізька	22	<i>S. Enteritidis</i> 11	Вінницька

Таблиця 2.2

Ізоляти *Salmonella enterica subspecies enterica ser. Typhimurium*, використані у дослідженнях

№	Ізолят	Географічне походження (Область)
1	<i>S. Typhimurium</i> PN	Київська
2	<i>S. Typhimurium</i> 000173	Черкаська
3	<i>S. Typhimurium</i> 771	Одеська
4	<i>S. Typhimurium</i> 16	Одеська
5	<i>S. Typhimurium</i> VM1	Миколаївська
6	<i>S. Typhimurium</i> VM2	Миколаївська
7	<i>S. Typhimurium</i> VM3	Черкаська
8	<i>S. Typhimurium</i> VM4	Черкаська
9	<i>S. Typhimurium</i> VM5	Чернігівська
10	<i>S. Typhimurium</i> S1	Херсонська
11	<i>S. Typhimurium</i> L1	Вінницька
12	<i>S. Typhimurium</i> M1003	Вінницька
13	<i>S. Typhimurium</i> Pg1	Черкаська
14	<i>S. Typhimurium</i> Pg2 (15)	Черкаська

**Ізоляти *Salmonella enterica subspecies enterica* різних сероварів,
використані у дослідженнях**

	Ізолят	Географічне походження (Область)
1	<i>S. Gallinarum</i> 15	Дніпропетровська
2	<i>S. Gallinarum</i> 25	Дніпропетровська
3	<i>S. Gallinarum</i> N1	Київська
4	<i>S. Gallinarum</i> 31	Київська
5	<i>S. Gallinarum</i> 0312	Херсонська
6	<i>S. Gallinarum</i> N18	Черкаська
7	<i>S. Infantis</i> 00317	Київська
8	<i>S. Infantis</i> 21	Миколаївська
9	<i>S. Infantis</i> 22s	Полтавська
10	<i>S. Infantis</i> 35	Івано-Франківська
11	<i>S. Virchow</i> L116	Львівська
12	<i>S. Virchow</i> 8v	Житомирська
13	<i>S. Virchow</i> O22	Київська
14	<i>S. Heidelberg</i> 1	Київська
15	<i>S. Heidelberg</i> 2	Миколаївська
16	<i>S. Hadar</i>	Черкаська
17	<i>S. Kentucky</i>	Львівська
18	<i>S. enterica</i> spp.	Київська
19	<i>S. enterica</i> spp.	Київська
20	<i>S. enterica</i> spp.	Черкаська
21	<i>S. enterica</i> spp.	Черкаська

2.3. Визначення чутливості штамів та ізолятів до антибактеріальних препаратів

Визначення чутливості проводили методом диск-дифузії. Чисту культуру ізоляту культивували на рідкому поживному середовищі Мюллера-Хінтона (HiMedia, Індія) за температури 37 протягом 18 годин та висівали на агар Мюллера-Хінтона (HiMedia, Індія). Читку реакції проводили відповідно до стандарту CLSI (таблиця 2.4) [285]. У якості контрольного штаму був використаний штам *E. coli* ATCC 25922.

Визначали чутливість до ампіциліну (AMP¹⁰), цефоперазону (CPZ⁷⁵), цефтазидиму (CAZ³⁰), цефтриаксону (CTR³⁰), тетрацикліну (T³⁰), доксицикліну (DO³⁰), стрептоміцину (S¹⁰), гентаміцину (GEN¹⁰), налідиксової кислоти (NA³⁰), ципрофлоксацину (CIP⁵), триметоприму (TR⁵) та хорамфеніколу (C³⁰). Використовували диски виробництва HiMedia (Індія).

Таблиця 2.4

Критерії інтерпретації діаметра зони затримки росту культури за стандартом CLSI

Антибактеріальний препарат	S (чутливий), мм	In (помірночутливий), мм	R (резистентний)
Ампіцилін	≥17	14-16	≤13
Цефоперазон	≥21	16-20	≤15
Цефтриаксон	≥ 23	20-22	≤19
Цефтазидим	≥21	18-20	≤17
Тетрациклін	≥15	12-14	≤11
Доксициклін	≥14	11-13	≤10
Стрептоміцин	≥15	12-14	≤11
Гентаміцин	≥15	13-14	≤12

Таблиця 2.4. Продовження

Антибактеріальний препарат	S (чутливий), мм	In (помірночутливий), мм	R (резистентний)
Налідиксова кислота	≥ 19	14-18	≤ 13
Ципрофлоксацин	≥ 31	21-30	≤ 20
Триметоприм	≥ 16	11-15	≤ 10
Хлорамфенікол	≥ 18	13-17	≤ 12

2.4. Індукція помірних фагів з використанням хіміотерапевтичного препарату Мітоміцин С

Чисту бактеріальну культуру висівали у 100 мл стерильного рідкого поживного середовища Luria-Bertani (Lennox) та культивували протягом 20 годин 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/мл. Культивування продовжували за температури 37 °С, 4 годин. Клітини осаджували центрифугуванням ($g=1000$, 10 хвилин), а отриманий надосад пропускали через фільтри з розміром пор 0,22 мкм.

Під ламінарною шафою готували серію десятикратних розведень фільтрату (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). У стерильні пробірки вносили по 1 мл розплавленого 0,7 % середовища Luria-Bertani (Muller), 1 мл розведення 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 °С протягом 20 годин та в подальшому визначали наявність зон лізису візуально.

2.5. Підбір праймерів для детекції генів факторів патогенності

Підбір праймерів для дослідження здійснювали в результаті аналізу наукової літератури щодо виявлення генів вірулентності у бактерій роду *Salmonella*. Вибір генів здійснювався таким чином, щоб охопити гени вірулентності з хромосомною локалізацією. Серед них були гени, що кодують білки інвазії – *invA*. Додатково праймери на таргетну ділянку гену *invA* використовувалися для підтвердження видової приналежності виділених культур сальмонели у полімеразній ланцюговій реакції.

Ізоляти висівали на бульйон Luria Bertani Miller (AppliChem, Німеччина), культивували протягом 24 годин за температури 37 °C та переносили на чашки з твердим середовищем Luria Bertani Lennox (Carl Roth, Німеччина). Через 24 години відбирали поодинокі колонії та виділяли ДНК за допомогою набору «ДНК-сорб» (Амплісенс, Російська Федерація).

Ідентифікацію таргетних генів і ділянок (*invA*, *agfB*, *sefA*, *prt*, *sull*, 5'-3'CS, *tetG*) та репліконів плазмід (*pN*, *pFIA*, *pFIIA*) проводили у полімеразній ланцюговій реакції з використанням відповідних праймерів (таблиця 2.5).

Таблиця 2.5

Олігонуклеотидні праймери, використані у дослідженні

Ген	Послідовність олігонуклеотидних праймерів (5'→3')	Розмір фрагменту ДНК (п.н.)	Автори
<i>invA</i>	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA	285	[270]
<i>agfB</i>	TGATGTTGACAATACTGGGTGCG CGATATACTGGCATCGTTGGCAT	293	Власна розробка
<i>sefA</i>	GCCGTACACGAGCTTATAGA ACCTACAGGGGCACAATAAC	310	[273]
<i>prt</i>	ATGGGAGCGTTTGGGTTC CGCCTCTCCACTACCAACTTC	624	[274]

Таблиця 2.5. Продовження

Ген	Послідовність олігонуклеотидних праймерів (5'→3')	Розмір фрагменту ДНК (п.н.)	Автори
<i>pFIA</i>	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462	[283]
<i>pN</i>	GTCTAACGAGCTTACCGAAG GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	559	[283]
<i>pFIIA</i>	CTGTCGTAAGCTGATGGC CTCTGCCACAAACTTCAGC	270	[283]
<i>tetG</i>	CAGCTTTCGGATTCTTACGG GATTGGTGAGGCTCGTTAGC	844	[275]
<i>sulI</i>	GTGACGGTGTTCTGGCATTCT TGAGTGCATAACCACCAGCC	378	[275]
5'- 3'CS	GGCATCCAAGCAGCAAGC AAGCAGACTTGACCTGAT	1009	[275]
<i>gipA</i>	ACGACTGAGCAGCGTGAGTTG GAAATGGTGACGGTAGAC	422	[269]
<i>sopE</i>	ACACACTTTCACCGAGGAAGCG GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG	398	[269]
<i>sodC</i> <i>I</i>	CGGGCAGTGTTGACAAAT AAAGTGTTGGAATTGTGGAGTC	424	[269]

Для ампліфікації генів *sulI*, *tetG* встановлювали наступні цикли:

- | | |
|--|-------------|
| 1. початкова денатурація – 95, 5 хвилин; | |
| 2. денатурація – 95, 30 секунд; | } 30 циклів |
| 3. відпал – 60, 60 секунд; | |
| 4. елонгація – 72, 30 секунд; | |
| 5. кінцева елонгація 72, 5 хвилин. | |

Для ампліфікації ділянки 5' – 3' CS встановлювали наступні цикли:

- | | | |
|----|--|-------------|
| 1. | початкова денатурація – 94, 10 хвилин; | |
| 2. | денатурація – 94, 60 секунд; | } 30 циклів |
| 3. | відпал – 55, 60 секунд; | |
| 4. | елонгація – 72, 3 хвилини; | |
| 5. | кінцева елонгація 72, 10 хвилин. | |

Результати ампліфікації візуалізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі (Thermo Scientific, Латвія) із концентрацією 1,5 % (1,2 % - для репліконів плазмід) та зберігали електрофореграми для подальшого аналізу із використання системи Gel Doc RX (Biorad, Сполучені Штати Америки).

2.6. Розроблення системи діагностики сальмонельозу птиці методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі

На початковому етапі здійснювався підбір олігонуклеотидних праймерів на основі аналізу баз даних нуклеотидних послідовностей. Зокрема були проаналізовані послідовності генів різних сероварів сальмонел. Пошук проводився засобами баз даних GenBank (Сполучені Штати Америки), EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека), DDBJ (Японська база даних). Відібрані послідовності було вирівняно та проаналізовано за допомогою програмного забезпечення – "Vector NTI" v.11.0.1 (Invitrogen, Сполучені Штати Америки). За результатами досліджень було обрано 3 таргетних ділянки для ідентифікації роду *Salmonella*, сероварів *S. Typhimurium* та *S. Enteritidis*.

Реакцію ампліфікації проводили на приладі Bio-rad CFX (Сполучені Штати Америки) з використанням наступного термопрофілю:

- 1) 1: 95,0 °C 5:00
- 2) 2: 95,0 °C 0:15
- 3) 3: 60,0 °C 0:50

Флуоресценцію вимірювали за барвниками Cy5 (*S. Typhimurium*), HEX (*S. Enteritidis*) та FAM (*Salmonella spp.*).

Послідовності олігонуклеотидних праймерів та зондів, використаних у дослідженні

5' - mod	Послідовність	3' - mod	
	GAAGCGGCTGCTACAACCAC	-	Typhimurium
	GATACGGCTACGGGCAGAAG	-	
Cy5	TGCTTTGGCACAGGTTGACACGTT	BHQ3	
-	CGTTATTGCCGAGGTGGATT	-	Enteritidis
-	TAAGGGGAGAGGGAAAGATGG	-	
HEX	TGAGCCAAAAACATATCCCATCCATT	BHQ2	
-	CTGTTTACCGGGCATACCATC	-	<i>Salmonella spp.</i>
-	TCGCACTGAATATCGTACTGGC	-	
FAM	CAAAACCCACCGCCAGGCTATCG	BHQ1	

Ампліфікацію всіх зразків здійснювали у трьох повторях. Результати ампліфікації із вказанням середніх значень представлено у таблицях та на діаграмах. Для всіх значень C_t було розраховано середнє квадратичне відхилення у ході визначення збіжності.

2.7. Методи статистичної обробки результатів досліджень

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

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Моніторинг розповсюдження сальмонел в Україні (2006–2019)

Для забезпечення ефективного контролю над інфекцією та пошуку шляхів її подолання етап лабораторних досліджень є необхідним та відіграє особливо важливу роль. Лабораторний етап досліджень дозволяє підтвердити або спростувати інфекційну природу захворювання та ідентифікувати збудника. Окрім того, дослідженню підлягають проби, виділені з тваринницьких господарств, відібрані при контролі харчової продукції, кормів та об'єктів навколишнього середовища [13].

В Україні лабораторні дослідження щодо інфекційної патології знаходяться під контролем Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів. Безпосереднє дослідження матеріалу здійснюється регіональними лабораторіями ветеринарної медицини. При постановці діагнозу необхідною умовою є виділення чистої живої культури з патологічного матеріалу [286]. Дана умова також зберігається при дослідженні проб, відібраних для моніторингу інфекції.

Загроза сальмонельозної інфекції полягає у можливій контамінації м'яса птиці, яєць та продуктів, що їх містять. Джерелом збудника інфекції може бути хвора птиця. В цьому випадку відбувається не лише падіж поголів'я та можлива контамінація продуктів забою і яєць, а й швидке розповсюдження інфекції в межах стада [287]. В окремих випадках існує висока імовірність перенесення інфекції від хворого стада здоровому поголів'ю. В такому випадку необхідне чітке дотримання профілактичних епізоотичних заходів та заходів з ліквідації інфекції у птахогосподарствах.

До вересня 2016 року профілактичні заходи щодо профілактики та контролю за сальмонельозною інфекцією визначалися положеннями Інструкції з профілактики та ліквідації сальмонельозу птиці, затвердженої Наказом №316 Державного комітету ветеринарної медицини від 03.08.2010

року. Відповідно до її положень, заключний діагноз ставлять за результатами ідентифікації збудника бактеріологічними, серологічними методами. А також на основі біохімічних властивостей виділеної культури збудника. Для постановки заключного діагнозу в якості додаткового методу вказано полімеразну ланцюгову реакцію, в основі якої лежить виявлення генетичного матеріалу бактерії у дослідному біологічному матеріалі.

За результатами досліджень у державних лабораторіях ветеринарної медицини, що надано Державним науково-дослідним інститутом з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, протягом 2006 року регіональними лабораторіями ветеринарно-санітарної експертизи було досліджено 143 тисячі 24 зразки матеріалу від хворої птиці. При цьому позитивними щодо сальмонельозу виявилися 0,86 % (1236 зразків). З них найбільшу кількість було виділено на території Донецької області (157 позитивних зразків – 12,7 % від загальної кількості 1236), Харківської (169 виділених культур – 13,67 %), Херсонської області (108–8,7 %), Дніпропетровської (106 позитивних зразків – 8,57 %) та Кіровоградської області (8,09 % - 100 позитивних зразків). Не було отримано жодного позитивного результату серед 9712 зразків, відібраних на території АР Крим, Закарпатської (1800 зразків) та Івано-Франківської областей (1146). Загальна кількість позитивних зразків із розподілом по регіонах представлено на діаграмі (рис. 3.1). Дещо менша кількість позитивних зразків була виявлена в 2007 році – 1179 при загальній кількості 149638. При цьому найбільша кількість походила з Волинської області – 140 зразків, з Луганської – 122, Миколаївської – 128, Сумської – 152 та Харківської області – 158. Жодної культури *Salmonella spp.* Не виділено у Закарпатській, Хмельницькій та Чернівецькій областях.

В наступному році високий рівень зберігався у Донецькій області, Луганській та Харківській. На противагу попереднім рокам, на території АР Крим було отримано 1 позитивний результат серед загальної кількості відібраних проб – 4828. Також порівняно з попереднім роком, у 2008 зроста

кількість позитивних зразків у Дніпропетровській області – 72 порівняно із 65 у 2007 році. У Луганській області, як і в попередні роки було зафіксована велика кількість позитивних зразків, яка продовжувала зростати до 2010 року.

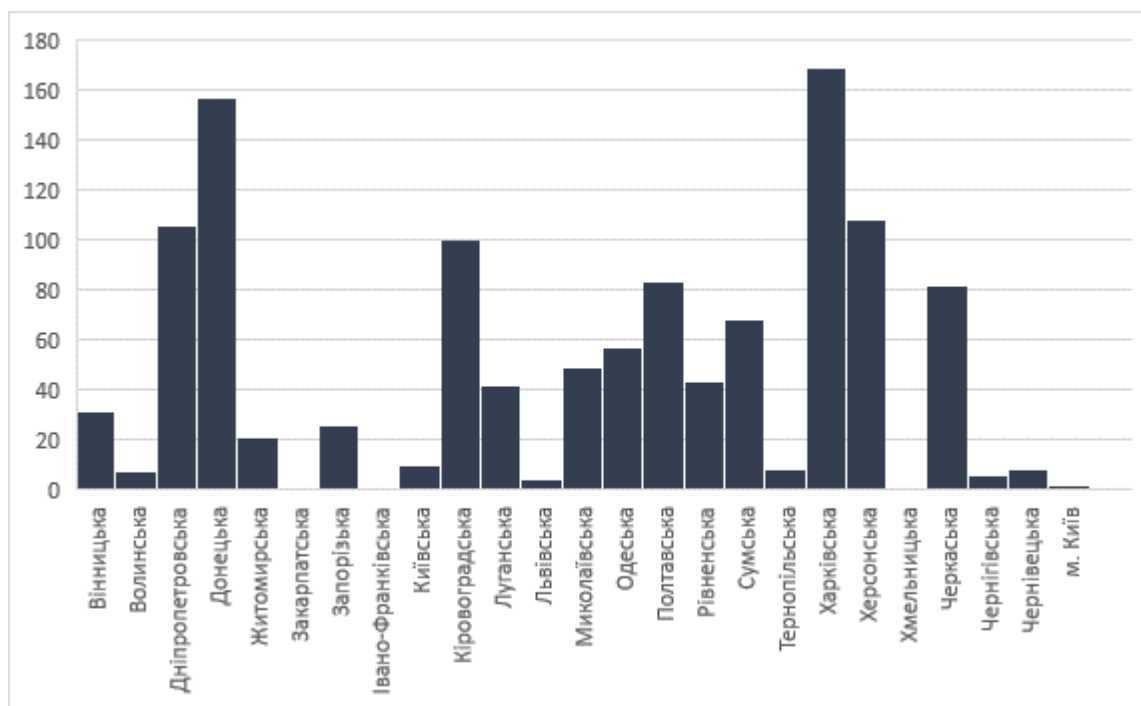


Рис. 3.1. Кількість культур *Salmonella spp.*, виділених з патологічного матеріалу за період 2006 р

В західних та південних областях було виявлено значно менше випадків сальмонельозу, в Закарпатській області, як і в попередні роки, - жодного. Окремо наведено дані щодо м. Києва, де у 2006 році було відібрано 69 зразків, з яких сальмонельоз було підтверджено у двох випадках. У 2007 році з 37 зразків позитивними були лише чотири, а у 2008 році з 50-ти зразків всі були негативними щодо сальмонельозної інфекції.

У 2009 році найбільше зразків було досліджено у Харківській області – 25988. З них – 161 позитивні. Також значна кількість зразків досліджувалась у Полтавській (17930), Львівській (16916) та Луганській (11508) областях. При цьому зі зразків, відібраних на території Львівської області, не виділено жодного позитивного. В той час як у Луганській було 142 позитивних зразки, а у Полтавській – 17. Жодного випадку сальмонельозу тварин не зафіксовано у Рівненській та Чернівецькій областях. Порівняно з попередніми роками

зростання розповсюдження інфекції відмічено у Дніпропетровській, Запорізькій Сумській та Чернігівській областях. Всього протягом 2009 року було досліджено 140 тисяч 571 зразок. З них позитивні – 900 (0,64 %).

Протягом 2010 року було досліджено 11679 зразків, з них – 8 позитивних. Два випадки сальмонельозу тварин було діагностовано у Дніпропетровській області, така ж кількість – у Закарпатській. Варто зазначити, що у попередні роки – з 2006 по 2009 на території Закарпатської області не було виявлено випадків сальмонельозної інфекції серед тварин. У Сумській області з 500 досліджених зразків 3 були позитивними.

Протягом 2011–2015 років сальмонельозна інфекція не виявлялась на території Чернівецької області, м. Київ, Рівненської та Закарпатської. Окрім 1 позитивного зразку у 2011 у Рівненській області, та 1 – Закарпатській. Проте спостерігали зростання кількості позитивних зразків у Донецькій області: 17 позитивних у 2011 році, 9 у 2012, та 17 у 2013 році. На рисунку 3.2. відображено динаміку розповсюдження сальмонельозу птиці в областях України за результатами лабораторних досліджень протягом 2012–2015 рр.

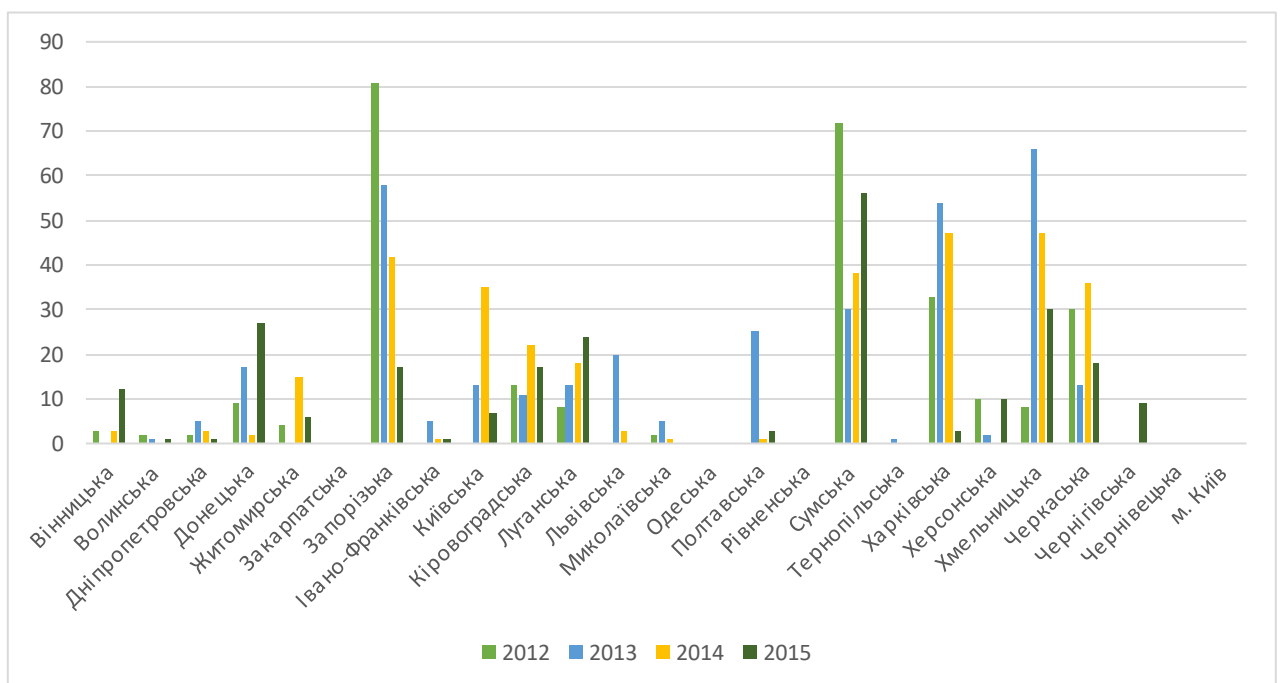


Рис. 3.2. Динаміка розповсюдженості сальмонельозу птиці в Україні за результатами лабораторних досліджень

В 2015 було виділено 25 позитивних зразків із загальної кількості 514. У Запорізькій області найбільша кількість позитивних зразків за 10-річний період була виявлена у 2012 – 81 зразок. З них 53 було виявлено серед 5940 зразків патологічного матеріалу, які надходили до лабораторій ветеринарної медицини з підозроб на сальмонельоз. За сальмонельозною програмою було відібрано 9220 зразків. З них позитивними щодо сальмонельозної інфекції було 28.

У Луганській та Сумській областях рівень захворюваності дещо знижувався протягом 2013–2014 років, проте у 2015 спостерігалось зростання поширеності інфекції: 56 позитивних зразків на території Сумської області порівняно із 30 у 2013 році, та 24 позитивних зразки у Луганській області – і 8 позитивних у 2012 році.

Лише один позитивний зразок було виявлено на території Одеської області в 2011 році та один позитивний у 2013 році на території Тернопільської області. В наступні роки в цих областях не було зафіксовано сальмонельозної інфекції. Також поступово знижувала кількість позитивних зразків, що виділяли на територіях Дніпропетровської та Волинської областей, а також Львівської та Миколаївської. На діаграмах представлено розподіл по областях за кількістю виділених позитивних зразків.

Інструкція з профілактики та ліквідації сальмонельозу птиці, затверджена в листопаді 2015 року одним із пунктів передбачає Програму лабораторного контролю за сальмонельозом. Відповідно до цього контроль за сальмонельозом передбачає відбір проб на всіх стадіях виробництва у птиці всіх вікових категорій та видів. Мінімальні вимоги включають відбір зразків у молодняку та дорослих продуктивних тварин, курей-несучок та продуктивних тварин яєчних порід. За умов утримання 1000 і більше голів курей-несучок у господарстві обов'язковим є відбір зразків при формуванні стада, у добовому віці, у віці від 22 до 26 тижнів та перед забоєм. При цьому результати лабораторних досліджень повинні бути відомими до відправлення птиці на забій. Також за 4 тижні до початку яйцекладки або за 2–4 тижні до

переміщення стада необхідним є відбір та дослідження зразків крові. Проби відбирають з періодичністю 1 раз на 15 тижнів.

Для племінних стад відбір зразків у пташниках та інкубаторіях проводиться за умов утримання більше 250 голів птиці. У пташниках вібриють проби від птиці добового віку, 4-тижневого та в індиків віком 30–35 тижнів. За 2 – 4 тижні перед яйцекладкою та/або переміщенням відбирають зразки крові. В період яйценосності відбір зразків проводять раз на два тижні. В інкубаторії – раз на 16 тижнів.

При утриманні бройлерів обов'язковим є відбір зразків перед забоєм з кожного пташника, якщо поголів'я птиці становить 5000 голів або більше. За утримання індиків – не менше 500 голів дорослої птиці.

Кількість відібраних зразків залежить від кількості поголів'я у стаді, оскільки вибірку формують таким чином, щоб можливим було виявлення 5 % розповсюдження інфекції у стаді. Таким чином, якщо птиця утримується у кількості 20 і менше голів, то дослідженню підлягає уся птиця. За умови 500 і більше голів необхідно відібрати 60 зразків.

За досліджень згідно Програми за 2015 рік було виявлено 63 позитивних щодо сальмонельозу зразків. Найбільша їх кількість – 28 зразків було виділено у Хмельницькій області. Значна кількість позитивних зразків походить із Запорізької області – 15 зразків. Дев'ять позитивних зразків при дослідженнях за Програмою контролю та ліквідації сальмонельозу було виділено у Херсонській області. Чотири ізоляти було виявлено у Київській області, три ізоляти – у Вінницькій. У Кіровоградській та Черкаській областях було отримано по два позитивних зразки. На рисунку 3.3. зображено розподіл виявлених у 2015–2019 роках ізолятів сальмонел за сероварами. За інформацією, наданою Держспоживслужбою, щодо результатів бактеріологічних досліджень, проведених державними лабораторіями ветеринарної медицини було виділено 239 ізолятів роду *Salmonella*. Відсоток сальмонел, виділених від птиці становив 77,4 %. Решта ізолятів були виділені з патологічного матеріалу свиней – 42 ізоляти, що становить 17,57 % від

загальної кількості. Лише два ізоляти було отримано в результаті дослідження зразків патологічного матеріалу великої рогатої худоби. Один із них після серологічного типування було віднесено до серовару *S. Typhimurium* групи В, інший залишився не типованим. Незначна кількість ізолятів – 4,18 % (4 ізоляти *S. Enteritidis* та 6 не типованих) було виділено з кормів, патологічного матеріалу хутрових звірів.

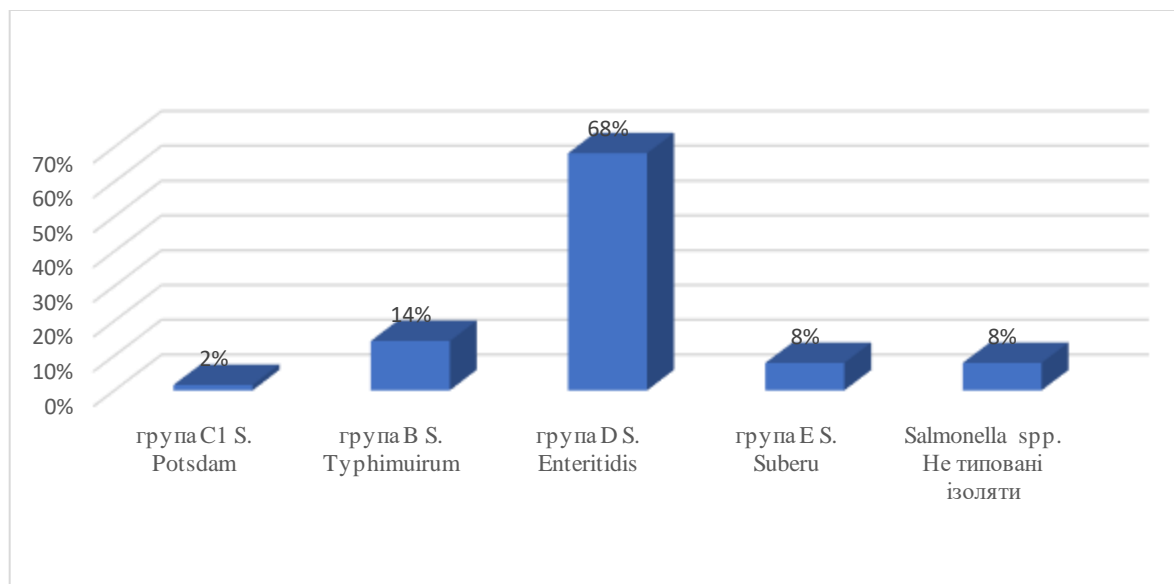


Рис. 3.3. Розподіл виявлених в Україні сальмонел за сероварами за результатами лабораторних досліджень у 2015–2019 рр

Значна кількість ізолятів, виділених з патологічного матеріалу птиці та посліду, відібраного в місцях утримання птиці, належала до серовару *S. Typhimurium*. Ізоляти серовару *S. Gallinarum* були виділені у кількості 35 культур, в той час як 22 ізоляти належали до біовару *Pullorum*. Також з патологічного матеріалу було виділено 6 ізолятів *S. Enteritidis*. З ембріонів було ізольовано дві культури, що відносились до серовару *S. Enteritidis*. Не типовані ізоляти виділяли у кількості 56 культур.

У 2015 році при проведенні бактеріологічних досліджень біологічного та патологічного матеріалу птиці було отримано 40 позитивних зразків. Зокрема від племінної птиці були виділено 5 культур *Salmonella* spp. В Запорізькій області. Також з посліду та патологічного матеріалу було виділено

дві культури *S. Gallinarum Pullorum* та один ізолят *Salmonella spp.* зі змивів. Серед зразків відібраних в інкубаторії позитивними були 5 зразків. Матеріалом в даному випадку був меконій, яйця, ембріони та підстилка. Один зразок належав до серовару *Typhimurium*, а чотири – до серовару *Enteritidis*. В зразках відібраних при утриманні курей-несучок виявлено 8 позитивних. Серовари *S. Enteritidis* у кількості 5 ізолятів та 3 ізоляти *S. Enteritidis* були виділені з трупів добоових курчат та підстилки з ящика для транспортування. При відборі посліду та меконію у стадах курей-несучок було виявлено 21 позитивний зразок: 16 ізолятів *S. Enteritidis*, 2 ізоляти *S. Typhimurium* та 3 ізоляти *S. Suberu*. При дослідженні зразків, відібраних при утриманні бройлерів було виділено один ізолят *S. Typhimurium*.

При дослідженні продукції птахівництва мікробіологічними методами, а також супутніх санітарно-гігієнічних дослідженнях протягом 2015 року було отримано 23 позитивних зразки. Серед них за результатами серологічного типування виділено 18 ізолятів *S. Enteritidis*. Один ізолят отримали з проб субпродуктів першої категорії: курячий шлунок, куряча печінка. Один ізолят *S. Enteritidis* виявлено у напівфабрикатах (м'ясо механічного обвалення), 4 ізоляти – з яєць та яєчних продуктів. Дев'ять ізолятів *S. Enteritidis* виділили зі змивів з яєць, інкубаційних лотків та яєчної шкаралупи. Три зразки з кормів були позитивними щодо наявності ізолята *S. Enteritidis*. Окрім цього зі змивів яєць, інкубаційних лотків та яєчної шкаралупи було виділено два ізоляти *S. Typhimurium*, два ізоляти *S. Suberu* та один ізолят *S. Potsdam*. Один ізолят *S. Typhimurium* було виявлено у якості контамінанта зразків м'яса птиці.

При дослідженні харчових продуктів та сировини тваринного походження в розрізі державних лабораторій ветеринарної медицини було виділено 47 ізолятів. Важливо зазначити, що серед них 53,19 % від загальної кількості були виділені з продуктів птахівництва, а саме: 4 ізоляти було отримано зі зразків м'яса птиці. При цьому два ізоляти належали до серовару *S. Enteritidis* та один ізолят – до серовару *S. Typhimurium*. Ці дані є мають важливе значення, оскільки дані серовари впродовж багатьох років домінують

серед збудників харчових токсикоінфекцій. Також встановлено, що більше половини випадків нетифоїдного сальмонельозу спричинені контамінацією харчових продуктів [288–289]. При цьому за різними даними кількість випадків захворювання внаслідок зараження сальмонелами оцінюють від 180 мільйонів на рік [290].

Зі зразків фаршу та ММО (м'ясо механічної обвалки) птиці було виділено 15 ізолятів *S. Infantis*, 1 ізолят *S. Virchow* та 3 нетипованих ізоляти *Salmonella spp.* З яєць та яєчних продуктів виділили два ізоляти *S. Enteritidis*. Якщо аналізувати розподіл за антигенною структурою, то серед ізолятів, виділених з продуктів птахівництва, домінуючими є *Infantis* та *Enteritidis*.

За даними Держспоживслужби, в результаті досліджень ветеринарно-санітарного контролю згідно з програмою контролю сальмонельозу птиці було виявлено 66 ізолятів *Salmonella spp.* Більшість із них (59 ізолятів – 89,39 %) походили з Хмельницької області.

Якщо проаналізувати джерела виділення культур бактерії, то вони походять з проб кормів, змивів з обладнання, яєць, а також з зі зразків вмісту яєць. Дев'ять культур віднесено до серовару *S. Enteritidis*, решта – нетиповані ізоляти груп D₁ та C. В результаті бактеріологічних досліджень патологічного та біологічного матеріалу було виділено сальмонели з підстилки, що використовувалась під час транспортування добового молодняка курей-несучок та з трупів курей-несучок. Всі виділені культури у кількості семи ізолятів в результаті серологічного типування були віднесені до серовару *Salmonella Enteritidis*. При дослідженні посліду, відібраного протягом періоду відкладення яєць було виділено 41 ізолят, серед яких 68,29 % (28 ізолятів) *S. Enteritidis*.

Результати досліджень продукції птахівництва та досліджень, проведених за програмою контролю сальмонельозу птиці яскраво висвітлюють розповсюдження в Україні убіквітарних сероварів, які є основними збудниками спалахів зоонозів. Найбільш значимими в цьому плані є серовари *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*. Окрім того, кількість

сальмонел, виділених від свійської птиці та з продуктів птахівництва помітно домінує над кількістю сальмонел, виділених з інших джерел. Так, у 2016 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 відносились до серовару *S. Gallinarum* та його біовару *Pullorum*. Решта були нетипованими, або ж відносились до сероварів *Typhimurium* та *Enteritidis*.

У 2017 році при проведенні 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. При проведенні 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 році), *Enteritidis* (19,7 %) та *Typhimurium* (15,5 %).

У 2018 році при проведенні 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 та яєчних продуктів курей та качок, стад бройлерів та продуктів забою курей та індиків. В лабораторіях ветеринарної медицини проводили дослідження сировини тваринного походження, харчових продуктів та кормів, за результатами яких виділили 121 культуру сальмонел. З них 20,7 % віднесено 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 році 40 культур сальмонел було виділено зі зразків біологічного та патологічного матеріалу тварин та птиці, з них 36 – від птиці. Серед цих культур 21 належали до серовару *Gallinarum*, 6 – *Typhimurium*.

При дослідженні сировини тваринного походження, кормів та харчових продуктів було виділено 73 культури сальмонел. З них 18 (24,6 % від загальної кількості) належали до серовару *Enteritidis*, 16 культур (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.

В результаті моніторингових бактеріологічних досліджень патологічного та біологічного матеріалу, кормів та змивів у відповідності до Інструкції з профілактики та ліквідації сальмонельозу птиці було виділено 28 культур *Salmonella spp* із 14 господарств з вирощування племінної птиці, бройлерів, племінної водоплавної птиці, стад курей-несучок, з інкубаційних станцій та продуктів забою бройлерів. Основна частина культур виділена з меконію добової птиці, яйцепроводів загиблої птиці, підстилки з ящиків для транспортування. При серологічному типуванні 7 культур було віднесено до серовару *Enteritidis*, 3 – до серовару *Infantis*; 2 культури ідентифіковано як *Typhimurium*.

Таким чином, аналіз виділення сальмонел на території України в період 2006–2019 років вказує на зменшення розповсюдження сальмонел на території України. Безумовно значну роль в цьому відіграє впровадження Програми щодо контролю та ліквідації сальмонельозу птиці, яка створює умови для значно кращого епізоотичного контролю. Однак результати лабораторних досліджень, проведених протягом останніх років свідчать про розповсюдження сероварів, які становлять загрозу для безпеки тваринництва, оскільки є убіквітарними – *Enteritidis*, *Typhimurium*. Контамінація продукції тваринництва даними сероварами створює загрозливу ситуацію для

безпеки харчової продукції тваринницької галузі, зокрема птахівництва, яка потребує постійного контролю для виявлення шляхів занесення інфекції в господарства.

На нашу думку, першим і основним кроком для вирішення даної проблеми є вдосконалення методів діагностики, оскільки методи, що використовуються сьогодні не можуть повністю вирішити проблеми та в умовах зростання об'ємів виробництва є

Додатковим фактором, що ускладнює проблему сальмонельозу є швидке зростання антибіотикорезистентності та поширення високопатогенних штамів сальмонел, які здатні інфікувати різні види ссавців та птицю. Таким чином, сальмонельозна інфекція приносить значні фінансові втрати та приносить збитки у галузь аграрної промисловості.

З огляду на вищезазначені умови, необхідним є дослідження біологічних властивостей сальмонел, що циркулюють на території України, дослідження їх молекулярно-генетичних основ патогенності. Зокрема, дослідження наявності генетичних детермінант, що підвищують патогенність та їх комбінації у різних популяцій. Методи діагностики, створені на їх основі, дозволять підвищити ефективність виявлення та ідентифікації високопатогенних сальмонел, що у свою чергу дозволить покращити контроль та попередити спалахи захворювання.

3.2. Виділення ізолятів виду *Salmonella enterica* та визначення серотипу в реакції аглютинації за схемою Вайта-Кауфмана

Щороку захворюваність на сальмонельоз зростає, що призводить до значних збитків у агропромислових господарствах. Переважно це стосується птахівництва. Зростання поголів'я птахів у промислових господарствах призводить до пропорційного зростання ризику інфікування сальмонелами. Найчастіше при контролі виявляють ізоляти сальмонел, що відносяться до убіквітарних сероварів Enteritidis, Typhimurium, Nadar, Kentucky, Infantis,

Heidelberg. Небезпека полягає в тому, що контамінація продукції сальмонелами даних видів може призводити до інфікування людини.

Для проведення досліджень нами було сформувано дві групи бактерій виду *Salmonella enterica*. До першої групи увійшли музейні штами з колекції Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. До цієї групи увійшли штами, що було виділено від різних видів тварин у період 1950–1970-х років 20 століття. (таблиця 3.1.).

Таблиця 3.1

Серологічна структура польових та музейних штамів, використаних в дослідженні

Музейні штами (n = 17)	Польові штами (n = 57)
Enteritidis (n = 2)	Enteritidis (n = 22)
Typhimurium (n = 4)	Typhimurium (n = 14)
Gallinarum (n = 4)	Gallinarum (n = 6)
Choleraesuis (n = 3)	
Dublin (n = 2)	
Abortusovis (n = 1)	
Adabraka (n = 1)	

До другої групи досліджених культур увійшли 57 ізолятів. Географічне походження ізолятів зображено на рисунку 3.6. Цифрами на карті вказано кількість досліджених ізолятів, що були виділені в конкретній області. До вибірки 57 польових штамів входили: 22 (38,6 %) ізоляти серовару Enteritidis, 14 (24,5 %) 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. 3.7).

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



Рис. 3.6. Розподіл ізолятів, використаних у дослідженнях за географічним походженням

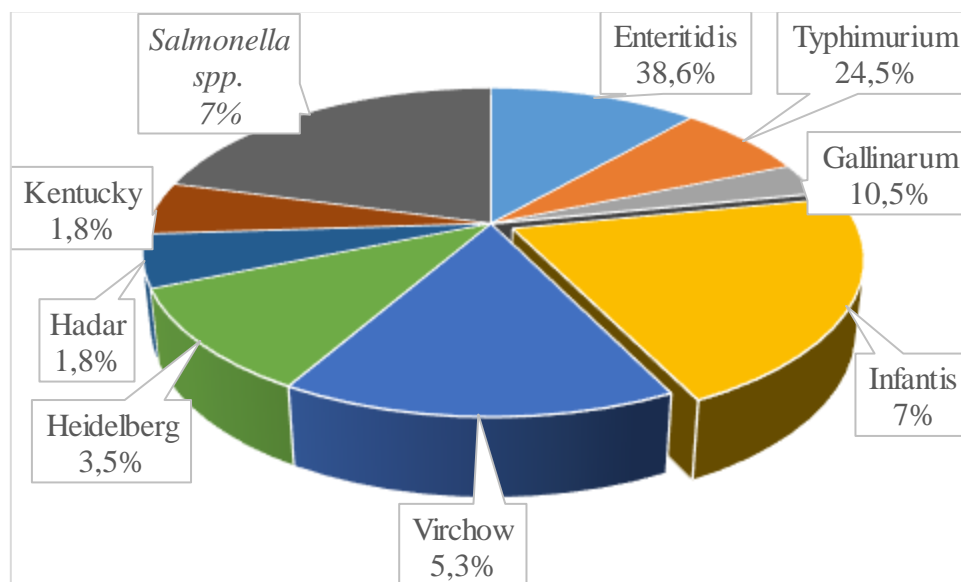


Рис. 3.7. Розподіл групи польових штамів (n=57) за сероварами

Диференційне середовище RajHans Medium (HiMedia, Індія), що є модифікацією класичного диференційного середовища Рамбаха також пригнічує ріст грампозитивної флори, але дозволяє диференціювати бактерії роду *Salmonella* від *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* та *Shigella flexneri*. Сальмонела утворює кислоту і пропілен гліколю, який є компонентом середовища. Дана кислота реагує з індикатором, в результаті чого колонії сальмонели в середовищі ростуть яскраво-рожевого кольору (рис. 3.8). Слід зазначити, що тифоїдні сальмонели на даному середовищі не утворюють рожевих колоній.



Рис. 3.8. Ізолят *Salmonella enterica* subsp. *enterica* на диференційному середовищі RajHans Medium (HiMedia, Індія)

На наступному етапі відбирали колонії з типовим для сальмонели ростом та проводили серологічне типування. Для виділення живої культури сальмонели всього у ході досліджень було використано 675 змивів. З них 128 було отримано з птахогосподарства яєчного типу. Решта – 547 змивів – було відібрано на території птахогосподарств з виробництва м'яса.

Зі 128 змивів, отриманих на території птахогосподарств яєчного типу в Київській області 4 давали типовий ріст на диференційному середовищі та на

середовищі XLD. На диференційному середовищі спостерігали яскраво-рожеві однорідні матові колонії діаметром 2-3 мм та просвітління фону середовища на місцях без колоній. На 2 добу після початку інкубації у місцях скупчення колоній спостерігали матовий наліт.

На середовищі XLD блискучі колонії мали чорний колір та діаметр 2-3 мм. Колір стерильного середовища був яскраво червоним, після інкубації – світлішав (рис. 3.9).



Рис.3.9. Ізолят *Salmonella enterica* на середовищі XLD (Himedia, Індія)

Колонії з типовим ростом чотирьох отриманих культур висівали на пробірки зі скошеним агаром та на чашки Петрі діаметром 55 мм для серотипування. Перед початком визначення серотипу частину бактеріальної маси культури змішували з краплею натрію хлориду NaCl для того, щоб впевнитися, що досліджувані культури не володіють самоаглютинацією. Жодна з культур не виявляла такої ознаки. На наступному етапі три культури позитивно реагували в реакції аглютинації (РА) на склі з омнівалентною

сироваткою, що є підтвердженням належності бактерії до роду *Salmonella*. Одна культура реагувала негативно з омнівалентною сироваткою, тому не була використана у наступних дослідженнях.

Для визначення О-антигену культури піддавали РА послідовно з сироватками різних груп. З цією метою відбирали культуру з поверхні скошеного агару бактеріальною петлею та змішували на склі з краплею групової О-антигенної сироватки. Всі три культури позитивно реагували з груповою сироваткою D, до якої входять антигени О-1, О-9, О-12, О-27, О-46. Також три культури позитивно реагували з моносироватками О-9 та О-12. Реакція з антигенами О-27 та О-46 були негативними. Для визначення Н-антигену відбирали частину культури з чашки Петрі з країв росту культури і змішували на склі з сироватками Н-антигену. 1 культура була негативною щодо всіх сироваток Н-антигену. Дві інші культури реагували позитивно з сироватками g, m. Реакція з сироватками на антигени e, h, i, k, l, v, z₁₃, z₂₈, z, 1, 2, 5, 6, 7, [e, n, x], [e, n, z₁₅] була негативною у всіх трьох ізолятів. Відповідно до схеми Вайта-Кауффмана [16] була ідентифікована антигенна формула ізолятів, що досліджувалися:

1. *Salmonella* Enteritidis (1, 9, 12: g, m: -);
2. *Salmonella* Enteritidis (1, 9, 12: g, m: -);
3. *Salmonella* Gallinarum (1, 9, 12: - : -).

Згідно зі схемою Вайта-Кауффмана, в ізолятів Enteritidis можуть бути додатково присутні антигени p, t, f у складі першої Н- фази, а також (зрідка) 1 та 7 у складі другої. Реакція сероварів, що були ідентифіковані як Enteritidis, із сироватками Н:p, Н:t та Н:f була негативною у всіх випадках. Реакція з сироватками Н:1 та Н:7 також була негативною. Антигенна приналежність до серовару Enteritidis була в подальшому підтверджена молекулярними методами: в класичній полімеразній ланцюговій реакції з електрофорезом та в ПЛР в режимі реального часу.

Змиви, відібрані на території птахогосподарств з виробництва курячого м'яса у кількості 547 було поділено на 3 групи: 180 та 153 змиви, відібрані на

території птахогосподарств у Київській області та 214 – на території птахогосподарств Черкаської області.

У першій групі із 180 змивів 5 були культивовані згідно вищезазначенох процедури з послідовними етапами: преселективне накопичення, селективне накопичення на напіврідкому середовищі та висів на диференційне на селективне середовище. У трьох культур спостерігали типовий ріст на селективного середовищі з ксилозо-лізин дезоксихолатом: чорні блискучі колонії діаметром 2-3 мм. У двох культур також спостерігався типовий ріст, проте колонії були значно меншого розміру. На диференційному середовищі спостерігали яскраво-рожеві колонії. На етапі серотипування чотири з п'яти культур позитивно реагували з омнівалентною сироваткою. Культуру, що реагувала негативно з омнівалентною сироваткою, в подальших дослідженнях не використовували. Позитивну реакцію на групову сироватку D спостерігали у двох ізолятів. Один ізолят позитивно реагував із сироваткою групи C. Ще один ізолят, що позитивно реагував з омнівалентною сироваткою, проте негативно з груповими сироватками B, D, C, E, використовували в дослідженнях як не типовий. За результатами серотипування було визначено наступні серовари:

1. *Salmonella Enteritidis* (1, 9, 12: g, m: -) – об'єднана проба зі змивів, відібраних у забійному цеху.
2. *Salmonella Gallinarum* (1, 9, 12: -: -) – клоакальний змив.
3. *Salmonella Enteritidis* (1, 9, 12: g, m: -) – культура, виділена з органів загиблої птиці.
4. *Salmonella enterica* spp.

Змиви, що відбирали на іншому птахогосподарстві та входили до групи з кількістю 153 проби, висівали за вищезазначеною методикою та отримали 1 позитивний ізолят. На середовищі XLD спостерігали дрібні чорні колонії з глянцеvim блиском. На диференційному середовищі – матові дрібні колонії рожевого кольору. Ізолят було виділено зі зразків, відібраних зі стрічок для видалення посліду. Ізолят позитивно реагував в РА з омнівалентною

сироваткою, утворюючи осад у вигляді дрібних пластівців білого кольору. Для визначення О-антигену ізолят піддавали послідовним реакціям до групових сироваток. Із сироватками групи В, D, Е отримували негативну реакцію. Реакція із груповою сироваткою групи С була позитивною. Відповідно до нової схеми, груповий поділ відбувається не за літерами латинського алфавіту, а за домінантним О-антигенним фактором. Група С₁-С₄ перейменована в групу О:7, оскільки даний фактор є стабільним, не піддається конверсії фагами та постійно присутній у ізолятів. Ізолят проявляв сильну аглютинацію з сироватками О:7, О:6 та О:14. Із сироваткою О:8 реакція була негативною. Для визначення Н-антигену відбирали частину бакмаси петлею та змішували з краплею антисироватки на фактори а, b, c, d, (e, h), (g, m), i, k, r, v, w, y, z₁₀, z₂₉, z₃₈, z₃₉. Позитивну реакцію спостерігали лише з антисироваткою фактора r. Ідентифікацію другої Н-фази здійснювали спочатку з груповими мультисироватками 1,2-1,5-1,6-1,7-z₆, e,n,x + e,n,z₁₅. Реакція з першою мультисироваткою була позитивною, тому додатково проводили реакцію з молосироватками 1,2, 5, 6, 7. Реакція з антисироватками до факторів 5,6,7 була негативною, на антисироватки до факторів 1,2 – позитивною. В результаті серотипування було визначено приналежність до серовару *Virchow* та антигенну формулу:

S. Virchow (6, 7, 14 :r:1,2).

Проби, відібрані на птахогосподарствах з виробництва курячого м'яса у кількості 214 були досліджені за вищезазначеною схемою. Насамперед проби розділили на 3 підгрупи, оскільки були відібрані у трьох різних господарствах. До першої підгрупи ввійшли 63 проби, до другої – 81, до третьої – 70 проб.

У першій підгрупі, що складалася із 63 проб позитивними були 8 проб. У другій підгрупі (81 проба) не було виявлено жодної позитивної проби, у третій (71 проба) 3 зразки були позитивними. Під час культивування на селективному та диференційному середовищі відбирали колонії з типовим ростом для подальшого серотипування. В ході серотипування, 3 ізоляти з першої підгрупи та 1 із третьої підгрупи не вступали в реакцію з

омнівалентною сироваткою. Тому в подальших дослідженнях дані ізоляти не використовували.

За результатами реакції аглютинації на склі з антисироватками було ідентифіковано наступні серовари:

1. *S. Typhimurium* (1, 4, [5], 12:i:1,2);
2. *S. Typhimurium* (1, 4, [5], 12:i:1,2);
3. *Salmonella Enteritidis* (1, 9, 12: g, m: -);
4. *Salmonella enterica spp.*;
5. *Salmonella enterica spp.*;
6. *S. Typhimurium* (1, 4, [5], 12:i:1,2);
7. *S. Typhimurium* (1, 4, [5], 12:i:1,2);

У ході досліджень було отримано ізоляти сальмонел з регіональних лабораторій ветеринарної медицини. Всі ізоляти висівали на диференційне середовище для сальмонел та на середовище XLD. Всі ізоляти давали типовий ріст на середовищі. Поодинокі колонії відбирали для подальших досліджень: індукції помірних бактеріофагів, визначення чутливості ізолятів до антибактеріальних препаратів та для молекулярно-генетичних досліджень.

Для зберігання культур бактерії відбирали колонії та висівали на скошений агар. Через 24 години отриману культуру змивали стерильним бульйоном МПБ та висівали у товщу напіврідкого агару. Для пригнічення метаболізму бактерій на поверхню напіврідкого агару в скляній пробірці нашаровували стерильну вазелінову олію у кількості 4-5 мл та зберігали за температури +4 °C (±1 °C).

За результатами бактеріологічних досліджень з'ясовано, що основна маса ізолятів була виділена від мертвих ембріонів, підстилки, яєць та кормів. Таким чином, можна зробити висновок, що джерелом занесення збудника господарства є в першу чергу інфікований молодняк. Контамінація підстилки та кормів, на нашу думку, відбувається через інфіковану птицю, яка розповсюджує збудник з фекаліями. Відповідно контамінується поверхня яєць, корми, підстилка та предмети догляду.

Більшість ізолятів було виділено на території Київської та Черкаської областей. Переважання серед ізолятів сероварів Enteritidis та Typhimurium підтверджує висновки попереднього розділу про домінування цих сероварів в Україні серед свійської птиці. Також варто зазначити, що нами було виділено також ізоляти серовару Gallinarum та Pullorum – збудники пулорозу і тифу, адаптовані до птиці, які спричиняють падіж поголів'я та наносить збитки птахогосподарствам.

Таким чином, сформована вибірка ізолятів сальмонел відображає стан епізоотичної ситуацію із сальмонельозу в Україні та є актуальним об'єктом для дослідження. Детекція генів факторів патогенності у даних ізолятів дозволить отримати дані про генетичні особливості популяцій бактерії роду *Salmonella*, які циркулюють серед свійської птиці. Аналогічні дослідження штамів НЦШМ, виділених в різні роки від різних видів тварин дозволить порівняти дані щодо генів факторів патогенності, кожен з яких відіграє важливу роль на різних етапах перебігу інфекційного процесу.

3.3. Детекція генів факторів патогенності методом полімеразної ланцюгової реакції

У генетичному матеріалі штамів *S. enterica* з колекції НЦШМ Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів, та ізолятів *S. enterica* різних сероварів проводили детекцію генів, що кодують фактори патогенності. Відбір генів для детекції проводили таким чином, щоб охопити основні етапи інфекційного процесу: колонізацію, адгезію, інвазію.

3.3.1. Детекція генів інвазії (*invA*), адгезії (*agfB*, *sefA*) та компоненту бактеріальної клітинної стінки (*prt*)

У генетичному матеріалі штамів *S. enterica* з колекції НЦШМ Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів, та ізолятів *S. enterica* різних сероварів проводили детекцію

генів, що кодують фактори патогенності. При цьому, визначали наявність генів факторів інвазії (*invA*), адгезії (*agfB*, *sefA*, *sopE*), колонізації (*gipA*, *sodC1*) та гену компоненту бактеріальної клітинної стінки (*pri*). Методику проведення дослідження описано вище у розділі «Вибір напрямів досліджень, матеріали і методи досліджень».

Ген із хромосомною локалізацією *invA* було виявлено у всіх дослідних штаммах та ізолятах. За результатами полімеразної ланцюгової реакції та електрофорезу в агарозному гелі було отримано фрагменти ДНК розміром 284 пар нуклеотидів, що відповідає розміру таргетної ділянки. У якості позитивного контролю використовували штам *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Abony NCTC 6017. Для негативного контролю було взято ДНК штаму *E. Coli* ATCC 25922. У лунці позитивного контролю на електрофореграмі отримували фрагмент розміром 284 п.н. У лунці негативного контролю амплікони були відсутні.

В результаті у 100 % досліджених штамів *S. enterica* з колекції НЦШМ було виявлено ген *invA*, про що свідчить наявність ампліфікованого фрагменту розміром 284 п.н. у всіх відповідних лунках (рис 3.10).

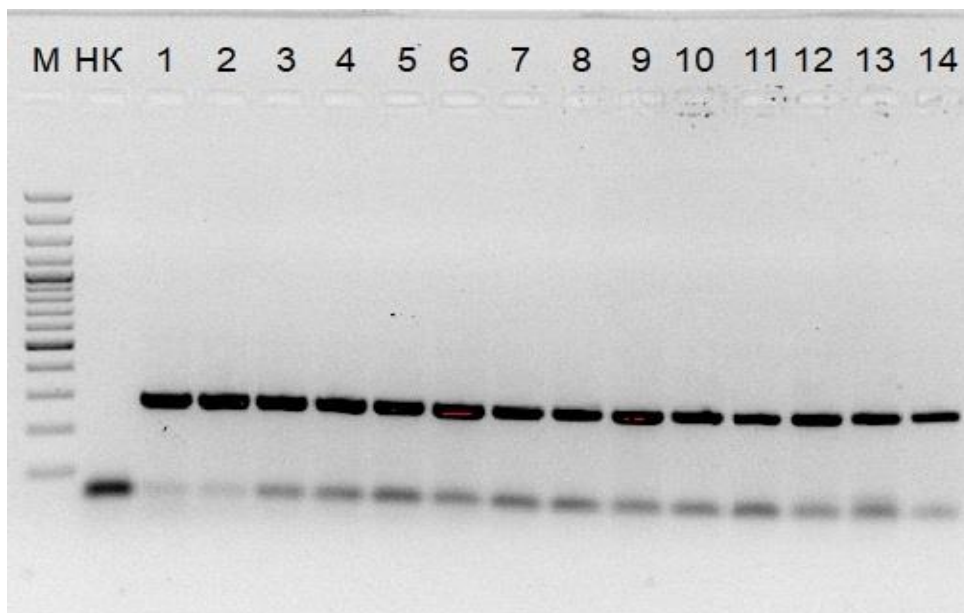


Рис. 3.10. Електрофореграма продуктів ПЛР на наявність гену *invA*

Для виявлення генів факторів адгезії було сконструйовано праймери для виявлення специфічних послідовностей гену *agfB*, що кодує субодиницю білка фімбрину, який є мономером тонких агрегативних фімбрій (пілей). Для детекції гену *sefA*, який кодує фімбрії SEF14 – фактор патогенності, що формує тонкі ворсини і забезпечує адгезію бактеріальної клітини до стінки тонкого кишечника. Даний фактор патогенності також бере участь у формуванні біоплівки. Водночас ген *prt* забезпечує синтез О-антигену сероварів, які відносяться до груп А і D1 виду *enterica*.

Ген *agfB* було виявлено у всіх досліджених ізолятів та у всіх штамів. На електрофореграмі візуалізувались амплікони розміром 293 п.н. Низкомолекулярні фрагменти не візуалізувались, що свідчить про відсутність неспецифічних реакцій. Фрагмент розміром 293 п.н. був присутній у лунці з ДНК штаму *Salmonella* Abony NCTC 6017. У лунці з негативним контролем (*E. coli* ATCC 25922) амплікони не візуалізувались. Ген *sefA* було виявлено у 11,7м% штамів (2 з 17) – у штаму *Salmonella* Enteritidis P1 та *Salmonella* Enteritidis M. Ген *sefA* було виявлено серед 22 ізолятів серовару Enteritidis (рис. 3.11.)

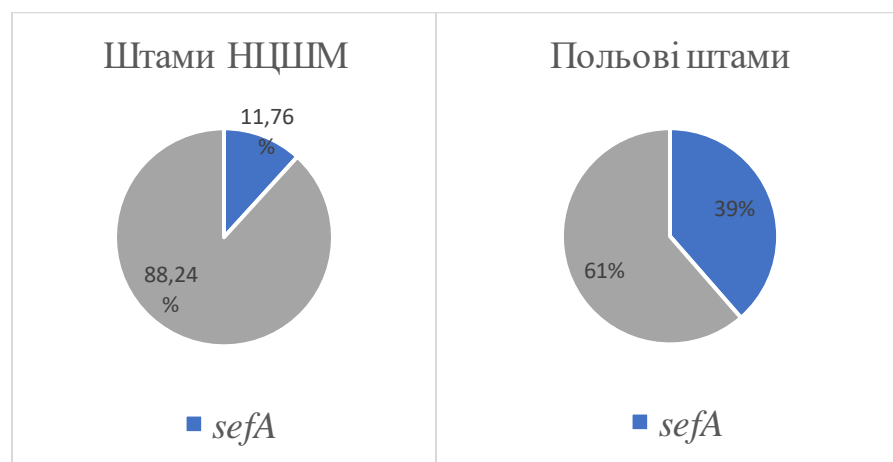


Рис. 3.11. Наявність гену *sefA* у штаммах НЦШМ та у польових штаммах

В результаті полімеразної ланцюгової реакції з праймерами на таргетну ділянку гена *prt* було отримано амплікони, які візуалізувались на

електрофореграмі у вигляді фрагментів дволанцюгової ДНК розміром 624 п. н. (рис. 3.12).

У групі штамів амплікони було виявлено у штамів *S. Pullorum* К, *S. Enteritidis* М, *S. Enteritidis* Р1, *S. Pullorum* Ставропольський, *S. Pullorum* Петелінський, *S. Pullorum* 941, *S. Dublin* К та *S. Dublin* 373 (таблиця 3.2). У решти штамів не спостерігали утворення специфічного фрагменту, що свідчить про відсутність даного гену у цих штамів. В результаті дослідження ізолятів *S. enterica*, було встановлено наявність гену *prt* у всіх ізолятах серовару Enteritidis, у всіх ізолятів серовару Gallinarum, та у двох нетипованих ізолятів *Salmonella* spp. (рис. 3.13).

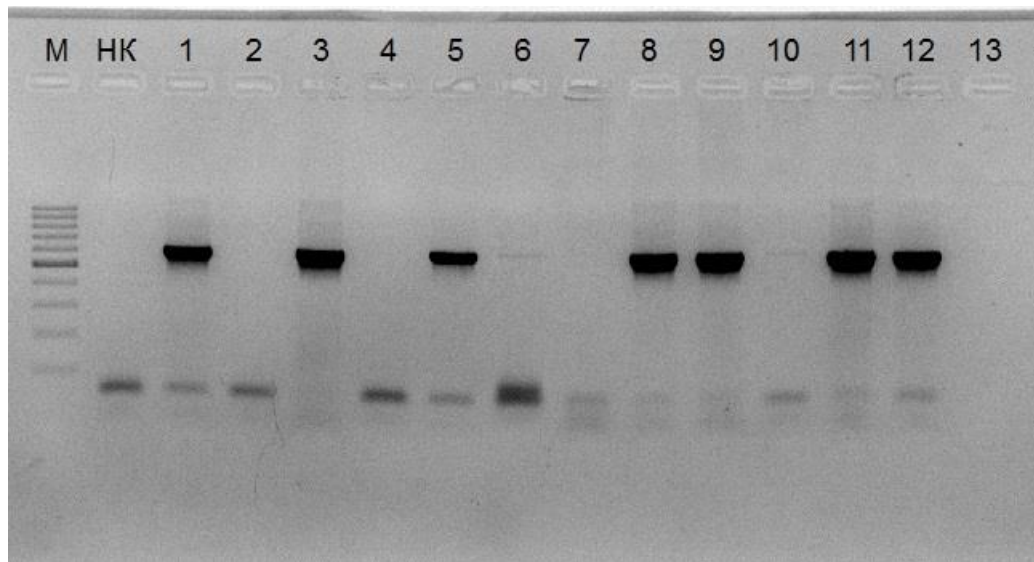


Рис. 3.12. Електрофореграма продуктів ПЛР на наявність гену *prt*

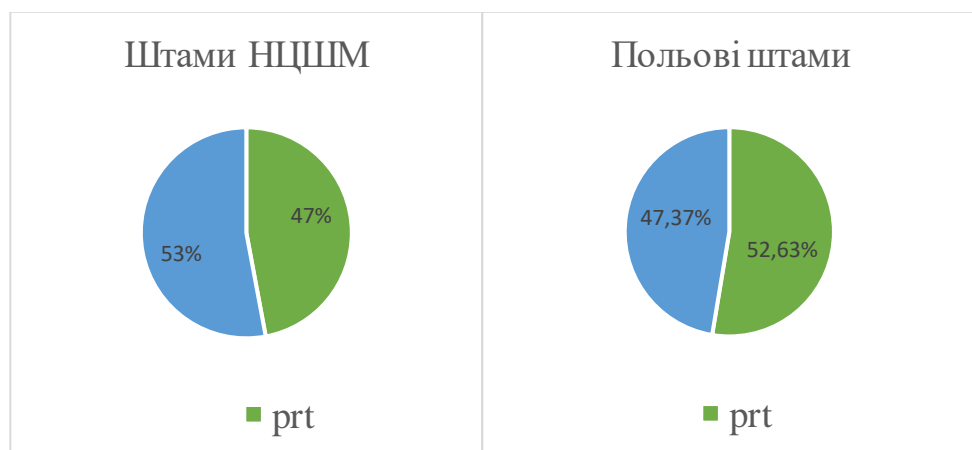


Рис. 3.13. Наявність гену *prt* у штаммах НЦШМ та у польових штаммах

Результати виявлення генів факторів патогенності у штаммах *S. enterica* з колекції НЦШМ

Штам	<i>invA</i>	<i>agfB</i>	<i>sefA</i>	<i>prt</i>
<i>S. Adabraka</i> 1	+	+	-	-
<i>S. Abortusovis</i> 372	+	+	-	-
<i>S. Typhimurium</i> 371	+	+	-	-
<i>S. Typhimurium</i> 144	+	+	-	-
<i>S. Typhimurium</i> B	+	+	-	-
<i>S. Typhimurium</i> 3	+	+	-	-
<i>S. Enteritidis</i> P1	+	+	+	+
<i>S. Enteritidis</i> M	+	+	+	+
<i>S. Pullorum</i> K	+	+	-	+
<i>S. Pullorum</i> Ставропольський	+	+	-	+
<i>S. Pullorum</i> Петелінський	+	+	-	+
<i>S. Pullorum</i> 941	+	+	-	+
<i>S. Choleraesuis</i> 9	+	+	-	-
<i>S. Choleraesuis</i> 370	+	+	-	-
<i>S. Choleraesuis</i> TC-177	+	+	-	-
<i>S. Dublin</i> 373	+	+	-	+
<i>S. Dublin</i> K	+	+	-	+

Отже, підтверджено наявність генів *invA* (інвазія) та *agfB* (адгезія) у 100 % досліджених штамів та ізолятів. Ген *invA* є спільним для всього роду *Salmonella* та часто використовується для підтвердження результатів бактеріологічних досліджень. У даному випадку, окрім підтвердження приналежності досліджених культур до роду *Salmonella* було також отримано підтвердження здатності ізолятів і штамів до інвазії епітеліальних клітин тонкого кишечника. Оскільки ген *invA* є ключовим у механізмі формування SCV (*Salmonella containing vacuoles* – сальмонеловмісні вакуолі) – специфічні фагосоми, які формуються збудником у цитоплазмі еукаріотичної клітини після етапу адгезії, перебудови цитоскелету та проникнення в клітину. Даний механізм дозволяє уникнути фагоцитозу та продовжувати персистенцію в організмі тварини.

Ген *agfB* є частиною оперону *agfABC*, який кодує механізм формування тонких агрегативних фімбрій. Молекулярні та біохімічні дослідження показали, що *agfB* бере участь у формуванні білкового комплексу SEF17 [272 – 291].

Наявність гену *sefA* виключно в ізолятах *S. Enteritidis* підтверджує дані про його специфічність для даного серовару та можливість використовувати у якості мішені для ідентифікації *Salmonella Enteritidis* у полімеразній ланцюговій реакції. Ген *sefA* входить до кластеру *sefABCD*, який кодує білок фімбрії SEF14 [292 – 294]. *SefA* кодує велику субодиницю білку, в той час як *sefB* – білок-шаперон [294].

Ген *prt* було виявлено у ізолятів сероварів *Enteritidis*, *Gallinarum*, а також у штамів сероварів *Enteritidis*, *Dublin*, *Gallinarum*. Даний ген кодує фермент паратозосинтазу, який регулює синтез клітинної стінки бактерії. В науковій літературі описано значна кількість варіантів одночасної ампліфікації гену *prt* з іншими специфічними генами для ідентифікації різних сероварів групи D, оскільки *prt* є специфічним для неї [295 – 299]. У даному випадку ми підтвердили наявність гену *prt*, а отже – наявність механізму для формування О-антигену [113].

Таким чином, проведені нами дослідження показують наявність у ізолятів та штамів генів, експресія яких забезпечує інвазію та адгезію у всіх сероварів *Salmonella*.

3.3.2. Детекція генів помірних бактеріофагів: *gipA*, *sopE*, *sodC1*

Ген *gipA* було виявлено у чотирьох штаммах *S. enterica* з колекції НЦШМ: *S. Abortusovis* 372, *S. Pullorum* K, *S. Choleraesuis* 370 та *S. Dublin* 373. Окрім того, ген *gipA* виявлено у таких ізолятів: *Enteritidis* 6L, *Typhimurium* PN061. В результаті електрофорезу в агарозному гелі було отримано фрагменти дволанцюгової ДНК розміром 422 п.н. (рис. 3.14).

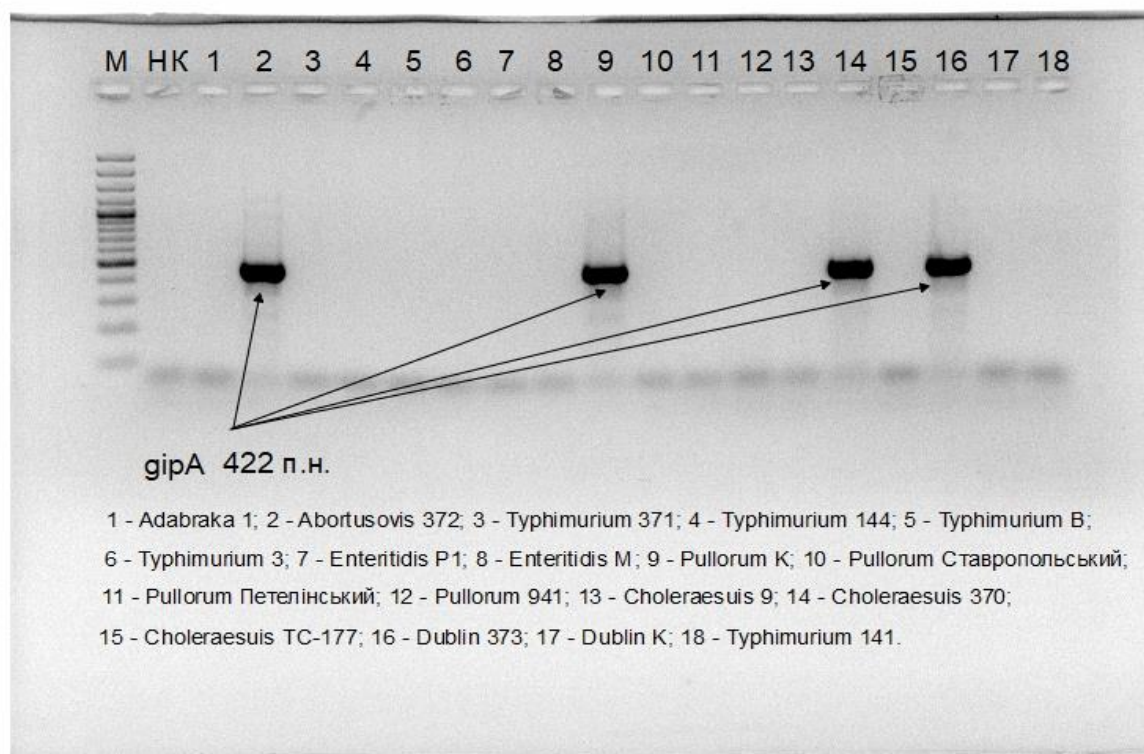


Рис. 3.14. Електрофореграма продуктів ПЛР на наявність гену *gipA*

Ген *sopE* було виявлено у 5 штаммах: *S. Pullorum* K, *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 з вищезазначеними штаммами було зафіксовано фрагмент дволанцюгової ДНК розміром 398 п. н. У решти штамів ген не було виявлено, про що свідчить відсутність фрагменту у відповідних лунках агарозного гелю. Неспецифічних продуктів реакції також не було виявлено. У якості негативного контролю було взято зразок, в який замість матриці ДНК додавали стерильну дейонізовану воду, очищену від ДНКз/РНКз.

Встановлено наявність гену *sodC1* у наступних штаммах: *S. Pullorum* K, *S. Pullorum* Ставропольський, *S. Pullorum* Петелінський, *S. Pullorum* 941, *S. Dublin* 373. На електрофореграмі було виявлено фрагменти дволанцюгової ДНК розміром 424 п. н. (рис. 3.15).

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

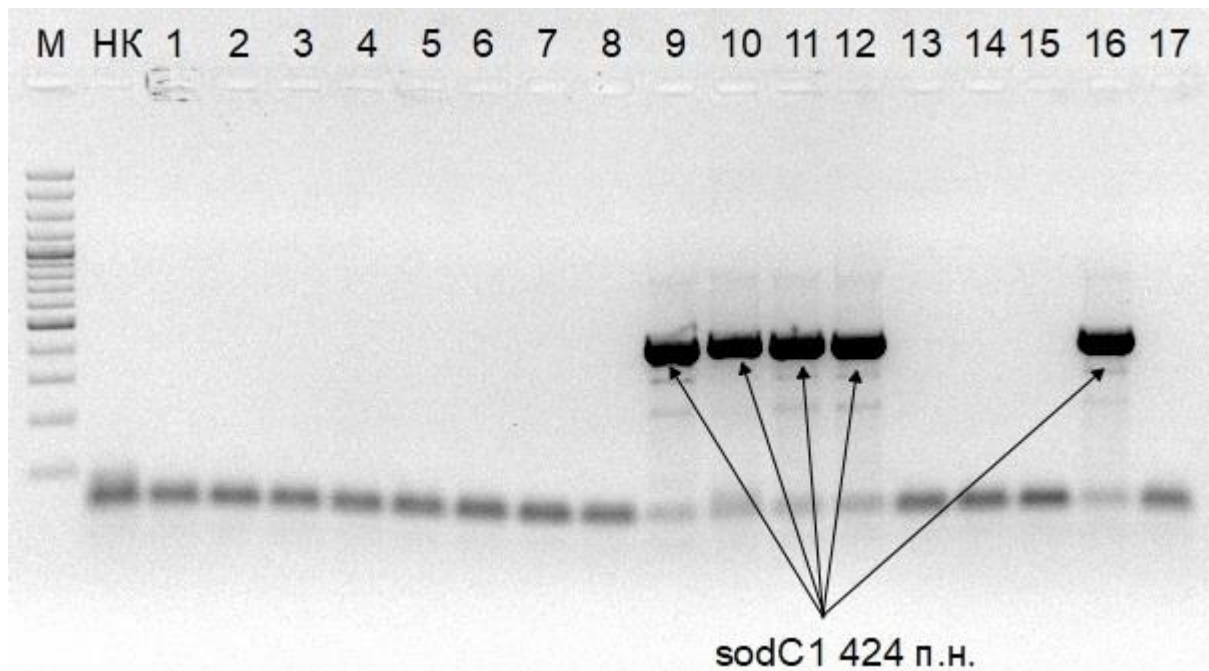


Рис. 3.15. Електрофореграма продуктів ПЛР на наявність гену *sodC1*

Значно більше поширення серед ізолятів мали гени *sopE* та *sodC1* – 77,19% та 56,14%, відповідно (рис 3.16).

Ген *sopE* було виявлено у 14 ізолятів Enteritidis, 11 ізолятів Typhimurium та у 14 ізолятів інших сероварів (4 ізоляти Gallinarum, 4 не типованих, 3 Virchow, 2 Infantis, 1 Nadar). Наявність гена *sodC1* встановлено у 16 ізолятів Enteritidis, 6 – Typhimurium та у 10 ізолятів інших сероварів (3 ізоляти Infantis, 3 не типованих, 2 Gallinarum, 1 Virchow та 1 Nadar).

При цьому лише три ізоляти Enteritidis та один – Typhimurium мали комбінацію з трьох генів. Комбінація генів *sopE+sodC1* зустрічалась у 12 ізолятів Enteritidis, 4 ізолятів Typhimurium, 3 не типований, 2 ізолятів Infantis, 2 Gallinarum, 2 Infantis та в ізоляту Nadar. Ген *gipA* зустрічався лише у комбінації *sopE+gipA+sodC1* або без двох інших (1 Enteritidis, 1 Typhimurium).

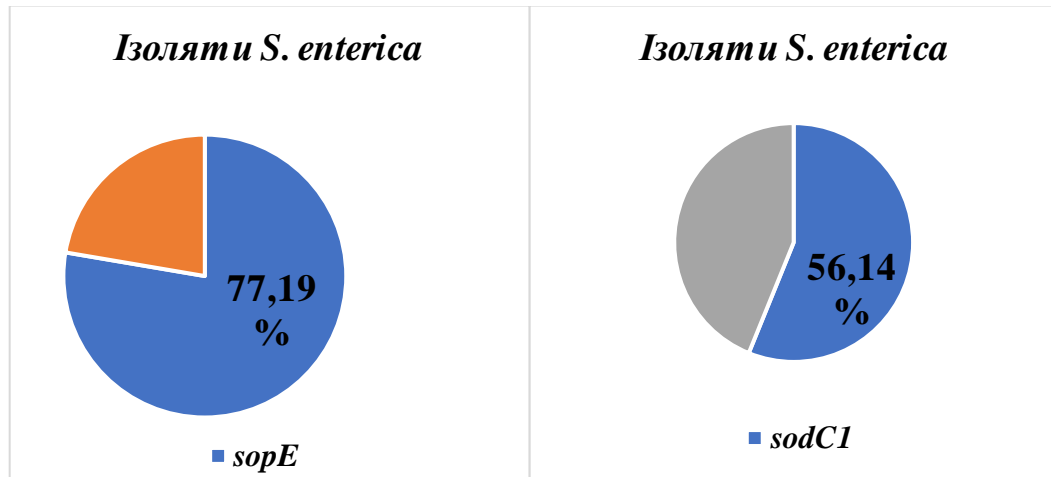


Рис. 3. 16. Наявність генів *sopE* та *sodC1* у ізолятах *S. enterica*

Серед штамів НЦШМ ген *gipA* був присутнім лише один (*S. Abortusovis* 372, *S. Choleraesuis* 370) або у комбінації *sopE*+*gipA*+*sodC1*. Така комбінація була виявлена у двох штамів: *S. Pullorum* К та *S. Dublin* 373. Наявність комбінації генів *sopE*+*sodC1* було встановлено у таких штамів: *S. Pullorum* Ставропольський, *S. Pullorum* Петелінський та *S. Pullorum* 941.

Наявність гену *prt*, що кодує фермент синтезу клітинної стінки (О-антигену) серогруп А та D₁ встановлено у восьми штамів: *S. Enteritidis* P1, *S. Enteritidis* M, *S. Pullorum* К, *S. Pullorum* Ставропольський, *S. Pullorum* Петелінський, *S. Pullorum* 941, *S. Dublin* 373, *S. Dublin* К. У решти штамів специфічна ділянка не ампліфікувалась, що свідчить про відсутність гену.

У 100 % ізолятів *Enteritidis* було виявлено ген *prt*, про що свідчить візуалізація на електрофореграмі фрагменту дволанцюгової ДНК розміром 624 пари нуклеотидів. У лунці з негативним контролем амплікони були відсутні. Ген *prt* було виявлено у 100 % ізолятів серовару *Gallinarum* (6 із 6), у ізоляту *S. Nadar*, а також у трьох нетипованих ізолятів *Salmonella enterica*. На електрофореграмах візуалізувались фрагменти дволанцюгової ДНК, що відповідали розміру 624 пари нуклеотидів.

3.3.3. Детекція репліконів плазмід

ПЛР на детекцію репліконів плазмід проводили з праймерами для виявлення специфічних ділянок, що відповідають послідовностям репліконів

плазмід наступних груп несумісності: N, FIA, FIIA. За результатами досліджень реплікони *pFIA* виявляли у 8 ізолятів: Enteritidis S1, Enteritidis 71, Enteritidis 8, Typhimurium Pg1, Infantis 1, та у трьох нетипованих ізолятів *Salmonella enterica*.

Серед штамів з колекції НЦШМ реплікон *pFIA* було виявлено у трьох з 17: *S. Gallinarum Pullorum* Ставропольський, *S. Gallinarum Pullorum* Петелінський, *S. Gallinarum Pullorum* 941. У лунках з позитивних результатом було виявлено фрагмент дволанцюгової ДНК розміром 462 пари нуклеотидів. Лунки з негативним результатом, а також лунка негативного контролю не містили фрагменту 462 п.н. та неспецифічних фрагментів. У групі ізолятів реплікон *pFIA* виявили у 6 культур: 3 Enteritidis, 1 Infantis та у двох нетипованих (рис. 3.17).

Реплікон *pN* не було виявлено у жодного штаму з колекції НЦШМ. Серед ізолятів виявляли 35 позитивних: 15 ізолятів Enteritidis (15 з 22, 68,18 %), 7 ізолятів Typhimurium (7 з 14, 50 %), 3 ізолятів Virchow (3 з 3, 100 %), 6 ізолятів Gallinarum (6 з 6, 100 %), 1 ізоляту Nadar (1 з 1, 100 %), 2 ізолятів Heidelberg (2 з 2, 100 %) та в одного нетипованого ізолятів *Salmonella enterica* (1 з 4, 25 %) (рис. 3.18).

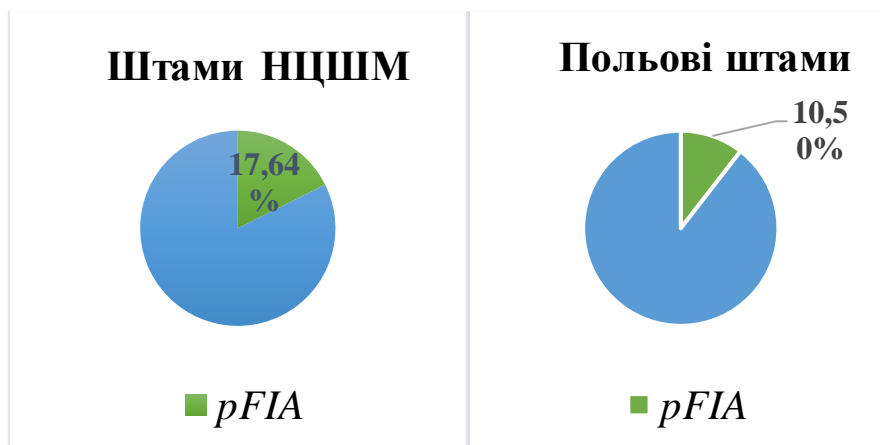


Рис. 3.17. Наявність реплікону *pFIA* у штамів НЦШМ та у польових штамів

Реплікон *pN* не було виявлено у жодного штаму з колекції НЦШМ. Серед ізолятів виявляли 35 позитивних: 15 ізолятів Enteritidis (15 з 22, 68,18 %), 7 ізолятів Typhimurium (7 з 14, 50 %), 3 ізолятів Virchow (3 з 3, 100 %), 6 ізолятів Gallinarum (6 з 6, 100 %), 1 ізоляту Nadar (1 з 1, 100 %), 2 ізолятів Heidelberg (2 з 2, 100 %) та в одного нетипованого ізолятів *Salmonella enterica* (1 з 4, 25 %) (рис. 3.18).

ізолятів Gallinarum (6 з 6, 100 %), 1 ізоляту Hadar (1 з 1, 100 %), 2 ізолятів Heidelberg (2 з 2, 100 %) та в одного нетипованого ізолятів *Salmonella enterica* (1 з 4, 25 %) (рис. 3.18).

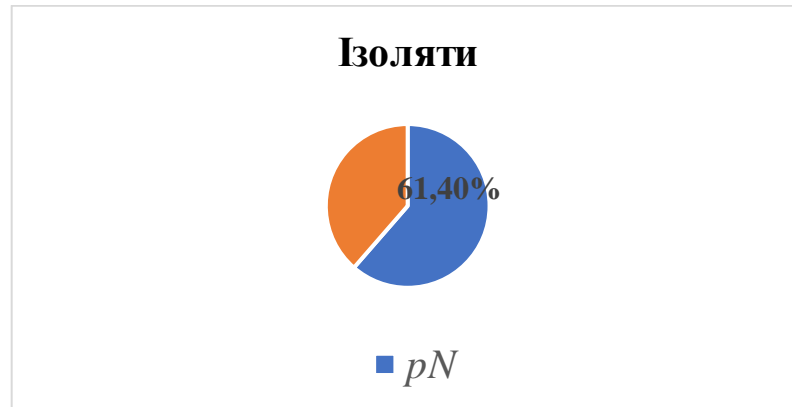


Рис. 3.18. Наявність реплікону *pN* у ізолятах *Salmonella enterica*

Реплікон *pFIIA* виявлено у 13 штамів з колекції НЦШМ: *S. Abortusovis* 372, *S. Typhimurium* B, *S. Enteritidis* M, *S. Gallinarum* Pullorum K, *S. Gallinarum* Pullorum Ставропольський, *S. Gallinarum* Pullorum Петелінський, *S. Gallinarum* Pullorum 941, *S. Choleraesuis* TC-177, *S. Dublin* 373 (рис. 3.19.).

Серед польових штамів *S. enterica* реплікон *pFIIA* було виявлено у 23 із 57 (40,35 %): 12 Enteritidis, 6 Typhimurium, 4 Infantis та один нетипований польовий штам *Salmonella enterica*.

Реплікони являють собою ділянку ДНК, де відбувається реплікація, яка починається з однієї точки – ориджина [167–168]. Таким чином, детекція реплікону плазмиди свідчить про можливість її реплікації у бактеріальній клітині, та відповідно, підтверджує наявність плазмиди.

Оскільки у геномі бактерії можуть міститися одночасно декілька плазмід з різним типом реплікації [170], нами було проведено детекцію трьох репліконів плазмід, які відносяться до різних груп несумісності. Дане поняття обґрунтовує класифікацію плазмід за типом реплікації тому, що плазмиди з однаковим типом реплікації не сумісні в межах одного бактеріального геному.

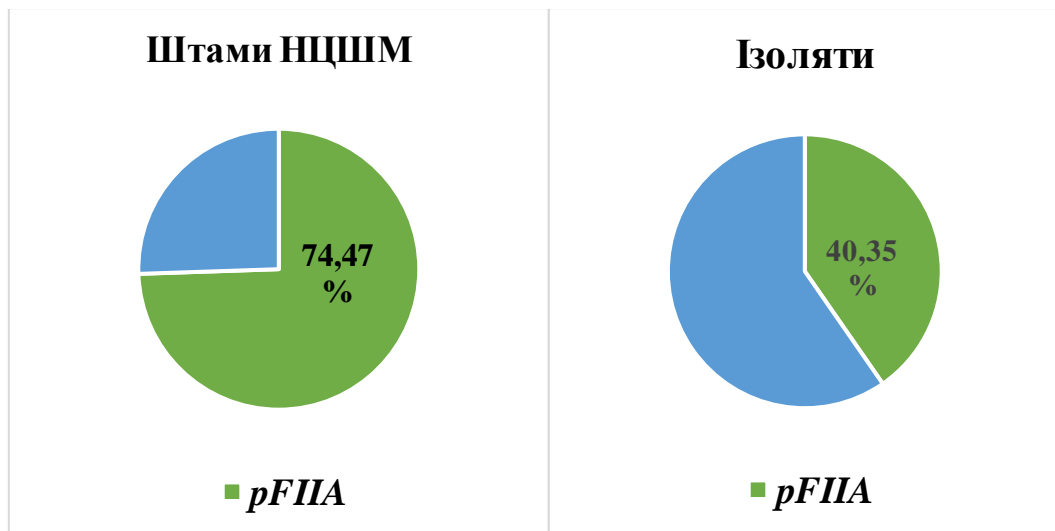


Рис. 3.19. Наявність реплікону *pFIIA* у *Salmonella enterica*

Отже, нами було доведено локалізацію плазмід трьох різних типів реплікації в геномі досліджених ізолятів та штамів. Результати детекції репліконів у штаммах викладено у таблиці 3.3.


Таблиця 3.3.

Результати детекції репліконів плазмід у штаммах *Salmonella enterica* з колекції НЦШМ

Штам з колекції НЦШМ	<i>pFIA</i>	<i>pN</i>	<i>pFIIA</i>
<i>S. Adabraka</i> 1	-	-	-
<i>S. Abortusovis</i> 372	-	-	+
<i>S. Typhimurium</i> 371	-	-	+
<i>S. Typhimurium</i> 144	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i> B	-	-	+
<i>S. Typhimurium</i> 3	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i> P1	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i> M	-	-	+
<i>S. Pullorum</i> K	-	-	+
<i>S. Pullorum</i> Ставропольський	+	-	+
<i>S. Pullorum</i> Петелінський	+	-	+
<i>S. Pullorum</i> 941	+	-	+
<i>S. Choleraesuis</i> 9	-	-	+

Таблиця 3.3 Продовження

Штам з колекції НЦШМ	<i>pFIA</i>	<i>pN</i>	<i>pFIIA</i>
<i>S. Choleraesuis</i> 370	-	-	+
<i>S. Choleraesuis</i> TC-177	-	-	+
<i>S. Dublin</i> 373	-	-	+
<i>S. Dublin</i> K	-	-	+

Примітки:  - відсутність реплікону; + - наявність реплікону.

3.3.4. Детекція генів резистентності до тетрациклінів (*tetG*), сульфаніламідів (*sulI*) та консервативної послідовності інтегрону *In104* (5'-3' CS)

Для аналізу наявності генів резистентності до антибактеріальних препаратів було проведено полімеразну ланцюгову реакцію на виявлення гену *tetG* (резистентність до тетрацикліну), *sulI* (резистентність до тетрацикліну) та консервативну послідовність інтегрону *In104*.

Ген *tetG* було виявлено в одного штаму з колекції НЦШМ – *S. Choleraesuis* 370. Решта 16 штамів з колекції були негативними щодо наявності гену *tetG*. У 19 з 57 (33,33%) досліджених польових штамів *Salmonella enterica* було виявлено ген *tetG*: 8 штамів Enteritidis, 3 штами Typhimurium, 3 Virchow, 3 Gallinarum та у двох нетипованих ізолятів *Salmonella enterica*. Наявність у лунці агарозного гелю фрагменту дволанцюгової ДНК розміром 844 пари нуклеотидів свідчила про позитивний результат.

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

Консервативну послідовність інтегрону виявляли в ПЛР з праймерами, що фланкують фрагмент ДНК розміром 1009 або 1197 пар нуклеотидів.

Наявність інтегрону було встановлено у наступних штамів з колекції НЦШМ: *S. Abortusovis* 372, *S. Typhimuirum* 144, *S. Typhimurium* 371, *S. Typhimurium* B, *S. Enteritidis* M, *S. Gallinarum* Pullorum K, *S. Gallinarum* Pullorum Ставропольський, *S. Gallinarum* Pullorum Петелінський, *S. Dublin* K.

У 13 польових штамів серовару *Enteritidis* було встановлено наявність консервативної послідовності інтегрону. Також встановлено, що дана послідовність наявна у 3 польових штамів серовару *Typhimuirum*, 3 *Infantis*, 2 *Virchow*, 1 *Gallinarum*, 1 *Hadar*, 2 *Heidelberg*, а також у двох нетипованих польових штамів *Salmonella enterica*.

У польових та музейних штамів було проведено детекцію генів антибіотикорезистентності та консервативної послідовності інтегрону. Останній є ділянкою, яка накопичує гени резистентності та забезпечує їхню реплікацію. Послідовність інтегрону було виявлено у окремих штамів НЦШМ, що свідчить про їхню здатність отримувати гени антибіотикорезистентності від популяцій сальмонел та інших ентеробактерій, що містять відповідні гени.

Позитивні результати генів резистентності до тетрацикліну та сульфанфламідів свідчать про наявність геномного острову 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.

Таким чином, за результатами проведених молекулярно-генетичних досліджень встановлено, що гени *invA* та *agfB* виявлено у 100 % польових та у 100 % музейних штамів. Ген *sefA* було виявлено у 11,7 % штамів (2 з 17) та у 22 польових штамів із загальної кількості 57 досліджених польових штамів (38,59 %). Ген *pri* було виявлено у 8 штамів НЦШМ (47,05 %) та у 32 польових штамів (56,14 %). Наявність гену *sodC1* встановлено у 5 (29,41 %) музейних штамів та у 32 (56,14 %) польових штамів. Ген *sopE* виявлено у 5 (29,41 %) музейних штамів та у 44 (77,19 %) польових штамів. Ген *gipA* було виявлено у 4 (23,52 %) музейних штамів та у 5 (8,77 %) польових штамів. Реплікони *pN* не було виявлено у музейних штамів. Однак його наявність було встановлено у

35 із 57 (61,40 %) досліджених польових штамів. Реплікон *pFIA* виявили у 4 (23,52 %) штамів НЦШМ та у 8 (14,03 %) польових штамів. Встановлено наявність реплікону *pFIIA* у 10 (58,82%) штамів НЦШМ та у 23 (40,35 %) польових штамів.

Встановлено наявність гену *tetG* у штаму *S. Choleraesuis* 370 з колекції НЦШМ та у 19 (33,33 %) польових штамів *Salmonella enterica*. Встановлено наявність гену *sulI* у чотирьох польових штамів та відсутність – у штамів з колекції НЦШМ. Консервативну послідовність інтегронувиявлено у 9 штамів НЦШМ (52,94 %) та у 27 (47,36 %) польових ізолятів. Матеріал розділу висвітлено у публікаціях [300–301].

3.4. Визначення чутливості до антибактеріальних препаратів

Дослідження чутливості проводилося до препаратів класу β-лактамів (амінопеніциліни: ампіцилін; цефалоспорини 3 покоління: цефоперазон, цефтриаксон, цефтазидим), аміноглікозидів (гентаміцин, стрептоміцин), інгібіторів дигідрофолатредуктази (триметоприм), феніколів (хлорамфенікол) та хінолонів (налідиксова кислота, ципрофлоксацин), тетрациклінів (тетрациклін, доксициклін).

Для дослідження було відібрано 2 групи: 57 ізолятів *Salmonella enterica* та 17 штамів *Salmonella enterica* з колекції Національного центру штамів мікроорганізмів (НЦШМ) Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ). Інтерпретацію отриманих результатів проводили згідно з критеріями CLSI. Дослідження методом диск-дифузії проводили тричі. Статистичну достовірність результатів встановлювали шляхом обчислення похибки середнього арифметичного.

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 загального числа штамів цієї групи. Резистентність до ампіциліну встановлено у 29 (50,87 %) польових штамів, помірну чутливість – у 6 (10,52 %) (Рис. 3.20).

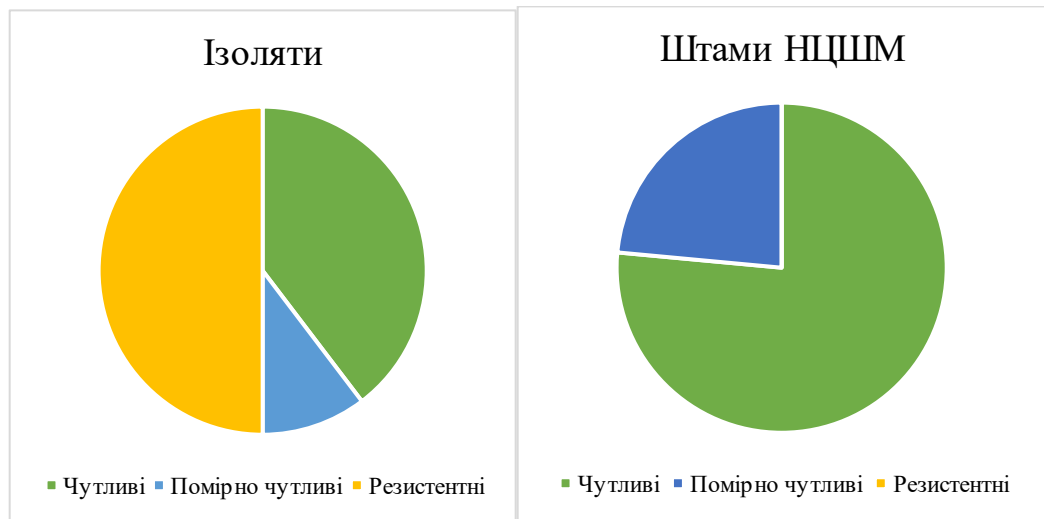


Рис. 3.20. Чутливість двох досліджених груп штамів до ампліциліну

Значно більшу резистентність було виявлено щодо класу цефалоспоринів: 40 ізолятів були резистентними до цефоперазону, 36 – до цефтриаксону, 37 – до цефтазидиму. Чутливість до цефоперазону спостерігали у 14 ізолятів. Чутливість до цефтриаксону та цефтазидиму проявляли 18 та 10 ізолятів відповідно (рис. 3.21).

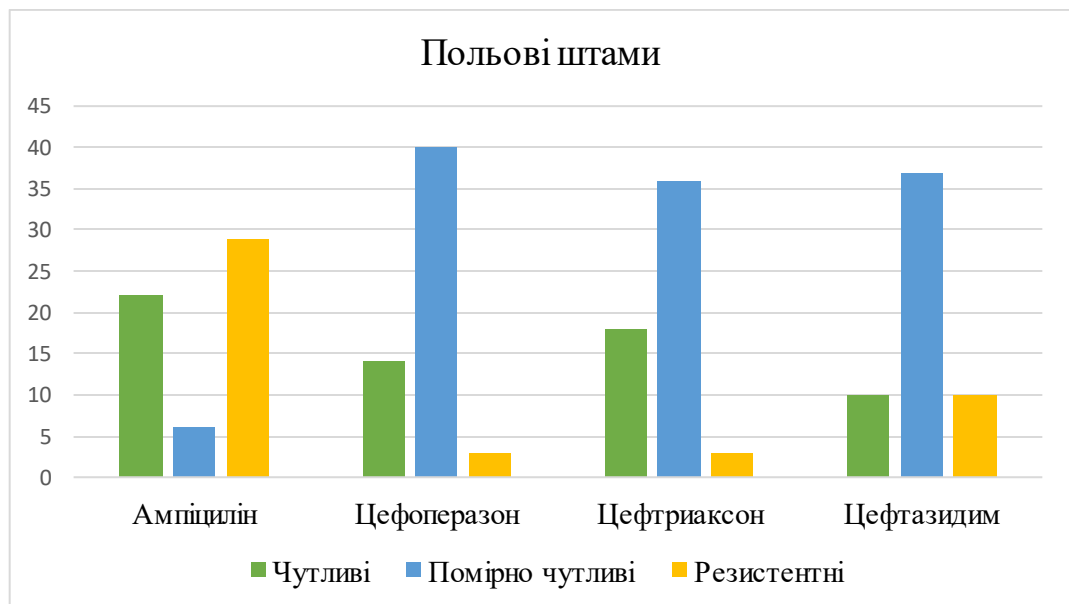


Рис. 3.21. Чутливість польових штамів до препаратів класу β-лактамів

У групі штамів з Колекції 13 були чутливими до цефоперазону, 4 – помірно чутливими. До цефтриаксону чутливість виявлено у 15 штамів, до цефтазидиму – у 16. Помірно чутливими до цефтриаксону були 2 штами, до цефтразидиму – 1 штаб. Серед музейних штамів не було виявлено жодного штаму, який був резистентним до даних антибактеріальних препаратів (рис. 3.22).

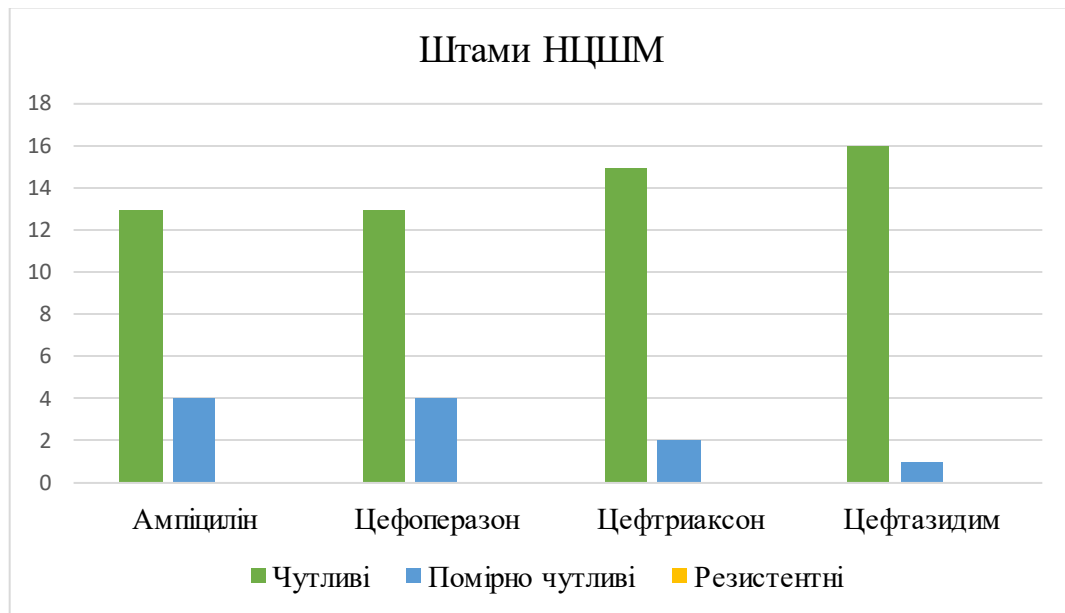


Рис. 3.22. Чутливість штамів НЦШМ до препаратів класу β -лактамів

Чутливість до тетрацикліну спостерігали у 19 польових штамів, до доксицикліну – у 22. Значно більшою була кількість резистентних польових штамів: 35 проявляли резистентність до тетрацикліну, 23 – до доксицикліну. Помірно чутливими до тетрацикліну були 3 польових штами. До доксицикліну помірну чутливість встановлено у 12 польових штамів (рис. 3.23). У групі штамів НЦШМ чутливість до тетрацикліну встановлено у 13 штамів, помірну чутливість – у трьох штамів, резистентність – в одного штаму. Чутливість до тетрацикліну встановлено у 12 штамів, помірну чутливість – у п'яти штамів. Жоден штаб з колекції НЦШМ не виявляв резистентність до доксицикліну (рис. 3.23).

В результаті визначення чутливості польових штамів та штамів НЦШМ до препаратів класу аміноглікозидів було встановлено чутливість до

стрептоміцину у 14 штамів з Колекції, та у 33 польових штамів. Резистентними до стрептоміцину були 19 польових штамів.

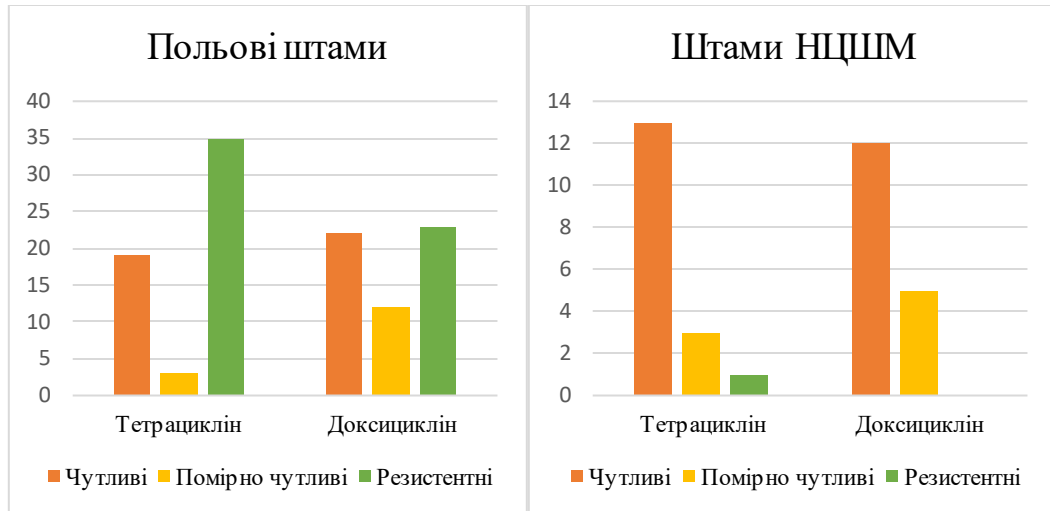


Рис. 3.23. Чутливість польових штамів та штамів НЦШМ до препаратів класу тетрациклінів

Помірну чутливість спостерігали у 5 польових штамів. Два штами з колекції НЦШМ – резистентні до стрептоміцину, один штама – помірно чутливий. У групі польових штамів 22 були чутливими до гентаміцину, 1 – помірно чутливий. Резистентність до гентаміцину встановлено у 34 польових штамів. Серед штамів НЦШМ чутливість до гентаміцину встановлено у 9 штамів, помірну чутливість – у трьох штамів, резистентність – у п'яти штамів (рис. 3.25).

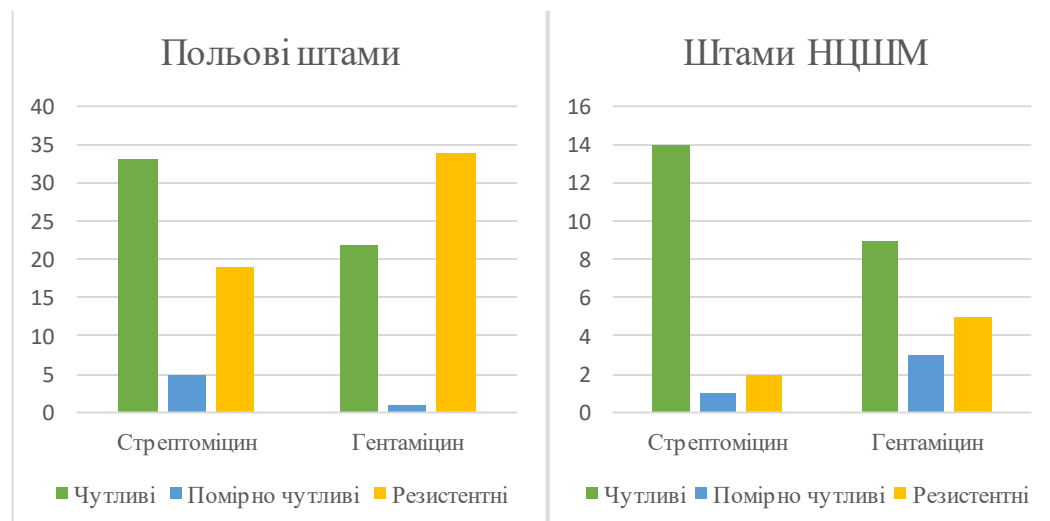


Рис. 3.24. Чутливість польових штамів та штамів НЦШМ до препаратів класу аміноглікозидів

За результатами досліджень було встановлено, що серед польових штамів 21 – були чутливими 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 (рис.3.25).

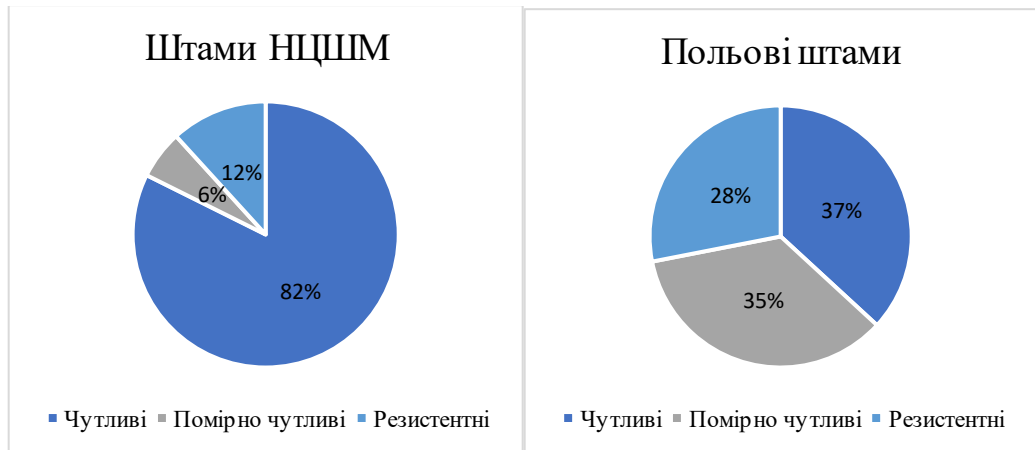


Рис. 3.25. Чутливість польових штамів та штамів НЦШМ до триметоприму

Встановлено, що 16 штамів НЦШМ є чутливими до налідиксової кислоти, до ципрофлоксацину – 14 штамів. Не виявлено жодного штаму, який проявляв би резистентність до ципрофлоксацину або налідиксової кислоти. Один штам проявляв помірну чутливість до налідиксової кислоти. Два штами були помірно чутливими до ципрофлоксацину (рис. 3.26).

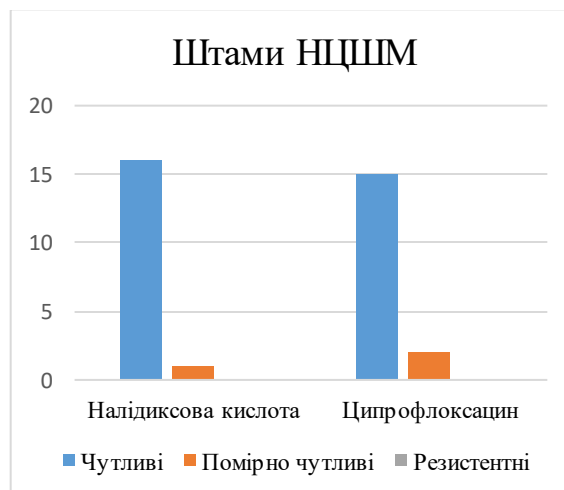


Рис. 3.26. Чутливість штамів НЦШМ до препаратів класу хінолонів

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 даного препарату було виявлено у 46 польових штамів. Помірно чутливими до ципрофлоксацину були 11 штамів (рис. 3.27).

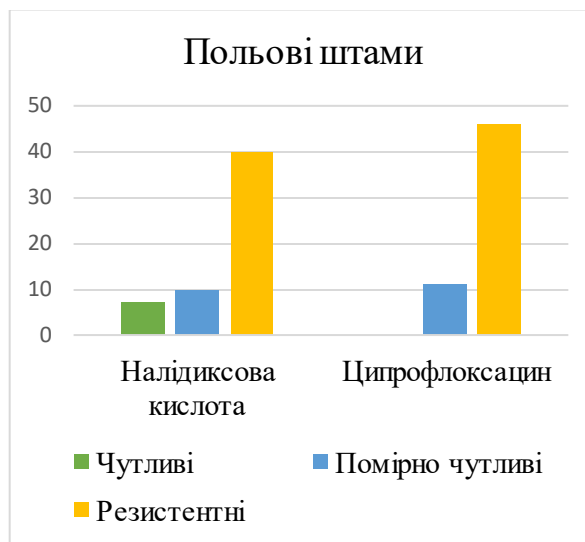


Рис. 3.27. Чутливість польових штамів до препаратів класу хінолонів

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 (рис. 3.28). Також резистентність встановлено у 23 польових штамів. Помірно чутливими до хлорамфеніколу були 14 штамів. Чутливість встановлено у 20 польових штамів (рис. 3.28).

За результатами проведених досліджень встановлено, що польові штами мають значно вищу резистентність до всіх досліджених антибактеріальних препаратів, ніж музейні штами (рис. 3.29).

Зокрема, у польових штамів встановлено дуже високий рівень резистентності до ципрофлоксацину (фторхінолони) та налідиксової кислоти (хінолони). Зростання резистентності до препаратів даного класу у сальмонел спостерігають з другої половини 90-х років. У науковій літературі описано

виділення резистентних до хінолонів сальмонел від продуктивних тварин в Європі та Південно-Східній Азії [176 – 179]. У В Німеччині при моніторингу чутливості сальмонел до хінолонів, їхня резистентність до налідиксової кислоти протягом 1986–1990 зростає з 0,2% до 14,8% [180].

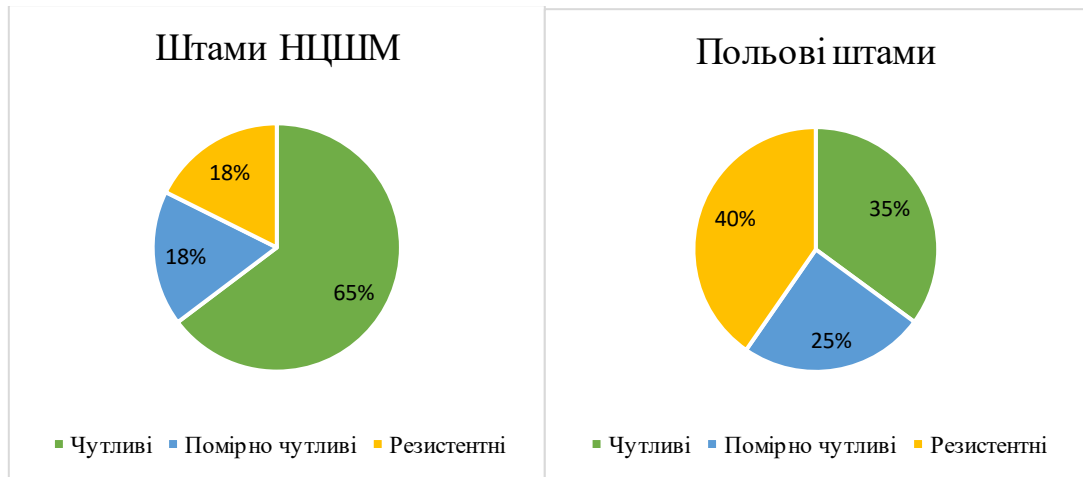


Рис. 3.28. Чутливість польових штамів та штамів НЦШМ до хлорамфеніколу

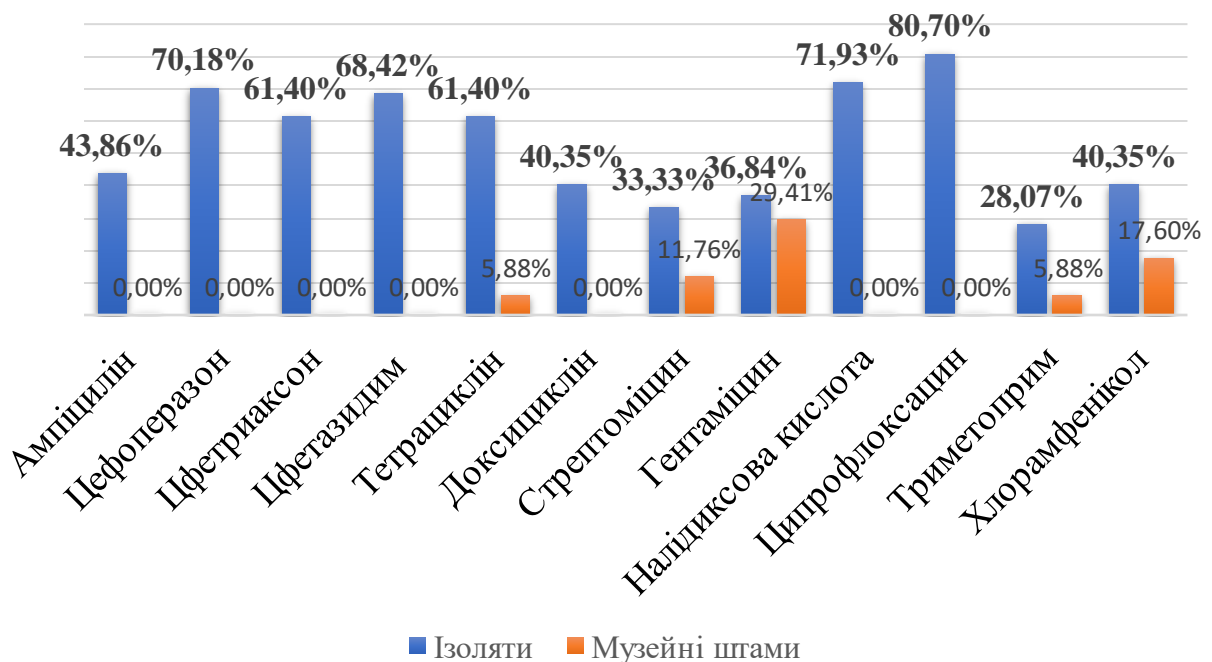


Рис. 3.29. Порівняння відсотку резистентних культур серед досліджених польових штамів та штамів НЦШМ до антибактеріальних препаратів

При цьому у більшості штамів, як у вищезазначеному моніторингу, так і в інших наведених дослідженнях, відмічали поєднання резистентності до налідиксової кислоти зі зниженням чутливості до фторхінолонів (ципрофлоксацин), що співпадає з нашими результатами.

Результати моніторингу чутливості сальмонел в європейських країнах показують зростання резистентності до хінолонів: 65,8 - 61,5 % резистентних до налідиксової кислоти ізолятів, виділених від бройлерів у 2013 – 2016 роках [181]. Окрім того у Європі, відмічають значну резистентність до тетрациклінів: 40 – 54 % в ізолятів, виділених з м'яса птиці різних видів [182]. У нашому дослідженні кількість резистентних до тетрацикліну ізолятів становила 61,4 %. Інші вітчизняні автори також відмічають значну резистентність сальмонел до препаратів класу тетрациклінів [183]. Матеріал розділу висвітлено у публікації [302].

3.5. Індукція помірних фагів з використанням Мітоміцину С

Серед бактеріофагів, що інфікують сальмонели є як літичні, так і помірні [303 – 305]. Така різноманітність дозволяє використовувати фаги з різною метою: для модифікації штамів з використанням трансдукції, для фаготипування та за інфекцій, викликаних антибіотикорезистентними штамми.

Серед помірних бактеріофагів сальмонел зустрічаються переважно представники родин *Myoviridae*, *Podoviridae* та *Siphoviridae* – дволанцюгові ДНК-віруси. Їхній геном являє собою два кластери генів, один з яких забезпечує інтеграцію та лізогенію, інших – літичний життєвий цикл. Вони організовані у вигляді мозаїчних структур із вставками негомологічних ділянок [306].

Значний внесок помірних фагів у патогенезі бактерій у першу чергу визначається генами, експресія яких забезпечує появу нових властивостей. Процес, який це забезпечує - горизонтальне перенесення генів, у патогенних

бактерій завжди спрямований на виживання їх у несприятливий умовах та підвищення вірулентності [307].

За певних умов лізогенний цикл бактеріофагів змінюється на літичний. Це відбувається за дії ультрафіолетового опромінення або за дії хімічних речовин, які розщеплюють ланцюг дезоксирибонуклеїнової кислоти. Однією з таких речовин є хіміотерапевтичний препарат мітоміцин С, який володіє високою мутагенністю [308]. У даному дослідженні використовувався протокол, розроблений на основі раніше опублікованих у науковій літературі та оптимізований нами для роботи з бактеріями роду *Salmonella* [309–310].

Таким чином, розрахунки титру бактеріофагів після індукції Мітоміцином С проводили за наступною формулою:

Кількість зон лізису (кількість видимих бляшок) $\times 10 \times$ зворотний коефіцієнт розведення.

$$2 \times 10^1 \times 10^6 = 2 \times 10^7.$$

Встановлено наявність зон лізису у 12 штамів НЦШМ із 17 досліджених, що свідчить про наявність помірних бактеріофагів у геномі бактерії.

В результаті індукції мітоміцином С не було виявлено жодної зони лізису у наступних штамів: *S. Typhimurium* В, *S. Enteritidis* М, *S. Gallinarum Pullorum* Ставропольський, *S. Choleraesuis* TC-177, *S. Dublin* К. При цьому гени помірних фагів *sopE*, *sodC1* було виявлено лише в одного з них – *S. Gallinarum Pullorum* Ставропольський.

У решти вищезазначених штамів не виявлено генів помірних фагів. У штамів, які мали комбінацію генів *sopE*, *sodC1* фаги були індуковані у різних титрах: 1×10^7 та 2×10^6 .

У штамів *S. Abortusovis* 372 та *S. Choleraesuis* 370, які мали ген *gipA* профаги були індуковані у титрах 1×10^5 та 3×10^4 , відповідно. У двох штамів, які мали комбінацію з трьох генів – *sopE*, *sodC1*, *gipA* – фаги ідукувалися в титрах 1×10^6 (*S. Gallinarum Pullorum* К) та 2×10^6 (*S. Dublin* 373).

Загальні результати індукції помірних бактеріофагів у штамх *S. enterica* subsp. *enterica* з колекції НЦШМ

Штам з колекції НЦШМ	Титр БУО	Гени помірних фагів
<i>S. Adabraka</i> 1	2×10^7	Не виявлено
<i>S. Abortusovis</i> 372	1×10^5	<i>gipA</i>
<i>S. Typhimurium</i> 371	4×10^4	Не виявлено
<i>S. Typhimurium</i> 144	1×10^7	Не виявлено
<i>S. Typhimurium</i> B	Зон лізису не виявлено	Не виявлено
<i>S. Typhimurium</i> 3	1×10^6	Не виявлено
<i>S. Enteritidis</i> P1	1×10^4	Не виявлено
<i>S. Enteritidis</i> M	Зон лізису не виявлено	Не виявлено
<i>S. Pullorum</i> K	1×10^6	<i>SopE1, sodC1, gipA</i>
<i>S. Pullorum</i> Ставропольський	Зон лізису не виявлено	<i>SopE1, sodC1</i>
<i>S. Pullorum</i> Петелінський	2×10^6	<i>SopE1, sodC1</i>
<i>S. Pullorum</i> 941	1×10^7	<i>SopE1, sodC1</i>
<i>S. Choleraesuis</i> 9	1×10^5	Не виявлено
<i>S. Choleraesuis</i> 370	3×10^4	<i>gipA</i>
<i>S. Choleraesuis</i> TC-177	Зон лізису не виявлено	Не виявлено
<i>S. Dublin</i> 373	2×10^6	<i>SopE1, sodC1, gipA</i>
<i>S. Dublin</i> K	Зон лізису не виявлено	Не виявлено

У ізолятів *S. Enteritidis* GT, *S. Enteritidis* K13, *S. Enteritidis* 4v, *S. Enteritidis* T16 не спостерігали зон лізису, однак попередньо було виявлено комбінацію гена помірної бактеріофагу *Gifsy-2* – *sodC1* (ген, який кодує периплазматичні супероксиддисмутази та відіграє важливу роль у патогенезі сальмонельозної інфекції), та *sopE* (ген фагу *sopEφ*, що кодує ефекторний білок, необхідний для початкових етапів інфекційного процесу). У ізолята *S. Enteritidis* 15 не спостерігали зон лізису, проте був виявлений ген *gipA*, експресія якого пов'язано з підвищеною вірулентністю, оскільки продукт експресії гені *gipA* підтримує колонізацію кишечника інфікованого організму [8]. Також не було

виявлено зон лізису у ізолята *S. Enteritidis* L2, який був позитивним у реакції ампліфікації щодо гена *sodC1*. Загальні результати індукції помірних бактеріофагів викладено в таблиця 3.4 – 3.7.

Серед ізолятів *S. Typhimurium* зон лізису не було виявлено лише у чотирьох: *S. Typhimurium* 000173, *S. Typhimurium* 16, *S. Typhimurium* VM4, *S. Typhimurium* M1003. У штама *S. Typhimurium* Pg1 не було виявлено генів помірних фагів, проте в результаті індукції з мітоміцином C виявили фаги у титрі 1×10^4 .

Також не було виявлено лізису в результатів індукції у штамів *S. Gallinarum* 15, *S. Gallinarum* 25, *S. Gallinarum* 0312, *S. Infantis* PN, *S. Heidelberg* 1, *S. Heidelberg* 2, *S. Hadar*, *S. Kentucky*, *S. enterica* spp.3.

Таблиця 3.5

Загальні результати індукції помірних бактеріофагів у ізолятах *S. enterica* subsp. *enterica* ser. *Enteritidis*

№	Ізолят	Титр	Гени
1	<i>S. Enteritidis</i> DN1	1×10^4	<i>sopE1</i>
2	<i>S. Enteritidis</i> DN3	2×10^6	<i>sopE1, sodC1</i>
3	<i>S. Enteritidis</i> N6	1×10^4	<i>sodC1</i>
4	<i>S. Enteritidis</i> 2679	4×10^7	<i>sodC1</i>
5	<i>S. Enteritidis</i> GT	Зон лізису не виявлено	<i>sopE1, sodC1</i>
6	<i>S. Enteritidis</i> 9	6×10^4	<i>sopE1</i>
7	<i>S. Enteritidis</i> 15	Зон лізису не виявлено	<i>gipA</i>
8	<i>S. Enteritidis</i> G22	3×10^7	<i>sopE1, sodC1, gipA</i>
9	<i>S. Enteritidis</i> 10	5×10^4	<i>sopE1, sodC1, gipA</i>
10	<i>S. Enteritidis</i> K13	Зон лізису не виявлено	<i>sopE1, sodC1</i>
11	<i>S. Enteritidis</i> P81	1×10^7	<i>sopE1, sodC1</i>
12	<i>S. Enteritidis</i> 6PR	1×10^4	<i>sopE1, sodC1</i>
13	<i>S. Enteritidis</i> 4v	Зон лізису не виявлено	<i>sopE1, sodC1</i>
14	<i>S. Enteritidis</i> S0822	4×10^5	<i>sopE1, sodC1</i>
15	<i>S. Enteritidis</i> L2	Зон лізису не виявлено	<i>sodC1</i>
16	<i>S. Enteritidis</i> S1	1×10^4	<i>sopE1, sodC1</i>
17	<i>S. Enteritidis</i> T16	Зон лізису не виявлено	<i>sopE1, sodC1</i>
18	<i>S. Enteritidis</i> PN	1×10^7	<i>sopE1, sodC1</i>

Таблиця 3.5. Продовження

№	Ізолят	Титр	Гени
19	<i>S. Enteritidis</i> P18	1×10^6	<i>sopE1</i>
20	<i>S. Enteritidis</i> 4	1×10^5	<i>sopE1</i>
21	<i>S. Enteritidis</i> 11	1×10^7	<i>sopE1, sodC1</i>
22	<i>S. Enteritidis</i> PgA2	2×10^3	<i>sopE1</i>

У штамів *S. Gallinarum* 25 та *S. enterica* spp.3., не дивлячись на відсутність зон лізису, було виявлено ген *sopE*. У штаму *S. Nadar* не було виявлено зон лізису, проте було ідентифіковано гени *sopE* та *sodC1*. У восьми штамів, в яких наявна комбінація генів *sopE, sodC1* було індуковано штами в титрах від 1×10^4 до 1×10^7 .

Таблиця 3.6

Загальні результати індукції помірних бактеріофагів у ізолятах *S. enterica* subsp. *enterica* ser. *Typhimurium*

№	Ізолят	Титр	Гени
1	<i>S. Typhimurium</i> PN	4×10^4	<i>gipA</i>
2	<i>S. Typhimurium</i> 000173	-	<i>sopE1, sodC1, gipA</i>
3	<i>S. Typhimurium</i> 771	1×10^6	<i>sopE1</i>
4	<i>S. Typhimurium</i> 16	-	<i>sopE1, sodC1</i>
5	<i>S. Typhimurium</i> VM1	1×10^7	<i>sopE1</i>
6	<i>S. Typhimurium</i> VM2	3×10^6	<i>SopE1, sodC1</i>
7	<i>S. Typhimurium</i> VM3	1×10^5	<i>sodC1</i>
8	<i>S. Typhimurium</i> VM4	-	<i>sopE1</i>
9	<i>S. Typhimurium</i> VM5	3×10^5	<i>sopE1, sodC1</i>
10	<i>S. Typhimurium</i> S1	4×10^4	<i>sopE1, sodC1</i>
11	<i>S. Typhimurium</i> L1	2×10^7	<i>sopE1</i>
12	<i>S. Typhimurium</i> M1003	-	<i>sopE1</i>
13	<i>S. Typhimurium</i> Pg1	1×10^4	Не виявлено
14	<i>S. Typhimurium</i> Pg2 (15)	1×10^5	<i>sopE1</i>

У сальмонел виявлено ряд генів, які кодують специфічні фактори і зумовлюють резистентність бактерії до дії макрофагів. В першу чергу – це

здатність синтезувати супероксиддисмутази, що забезпечує подальшу адгезію та колонізацію.

Таблиця 3.7

Загальні результати індукції помірних бактеріофагів у ізолятах

S. enterica subsp. *enterica*

№	Ізолят	Титр	Гени помірних фагів
1	<i>S. Gallinarum</i> 15	Зон лізису не виявлено	Не виявлено
2	<i>S. Gallinarum</i> 25	Зон лізису не виявлено	<i>sopE</i>
3	<i>S. Gallinarum</i> N1	2×10^4	<i>sopE</i> , <i>sodC1</i>
4	<i>S. Gallinarum</i> 31	3×10^5	<i>sopE</i>
5	<i>S. Gallinarum</i> 0312	Зон лізису не виявлено	Не виявлено
6	<i>S. Gallinarum</i> N18	1×10^7	<i>sopE</i> , <i>sodC1</i>
7	<i>S. Infantis</i> 00317	2×10^5	<i>sopE</i> , <i>sodC1</i>
8	<i>S. Infantis</i> 21	2×10^6	<i>sodC1</i>
9	<i>S. Infantis</i> PN	Зон лізису не виявлено	Не виявлено
10	<i>S. Infantis</i> 35	1×10^5	<i>sopE</i> , <i>sodC1</i>
11	<i>S. Virchow</i> L116	3×10^7	<i>sopE</i>
12	<i>S. Virchow</i> 8v	1×10^4	<i>sopE</i> , <i>sodC1</i>
13	<i>S. Virchow</i> O22	1×10^7	<i>sopE</i>
14	<i>S. Heidelberg</i> 1	Зон лізису не виявлено	Не виявлено
15	<i>S. Heidelberg</i> 2	Зон лізису не виявлено	Не виявлено
16	<i>S. Hadar</i>	Зон лізису не виявлено	<i>sopE</i> , <i>sodC1</i>
17	<i>S. Kentucky</i>	Зон лізису не виявлено	Не виявлено
18	<i>S. enterica</i> spp. 1	2×10^4	<i>sopE</i> , <i>sodC1</i>
19	<i>S. enterica</i> spp. 2	3×10^5	<i>sopE</i> , <i>sodC1</i>
20	<i>S. enterica</i> spp. 3	Зон лізису не виявлено	<i>sopE</i>
21	<i>S. enterica</i> spp. 4	1×10^6	<i>sopE</i> , <i>sodC1</i>

Ген, що кодує *Cu/Zn*-залежні супероксиддисмутази *sodC1* відноситься до профагу *Gifsy-2*, який широко розповсюджений серед штамів *S. Typhimurium*, а також зустрічається у деяких штамів, що відносяться до сероварів *Newport*, *Dublin*, *Weltevreden*, *Choleraesuis* та *Paratyphi C* [311]. Ще один помірний бактеріофаг, що також відноситься до родини *Siphoviridae* – *Gifsy-1* містить ген *gipA*. Білок, який кодується цим геном, виконує функцію колонізації тонкого кишечника. Це дозволяє бактерії розмножуватися

тривалий час для накопичення популяції, достатньої для інвазії. Остання відбувається за участі системи секреції білків 3 типу (T3SS1) [312]. Завдяки цьому у клітину доставляється ряд білків, які виконують функцію перебудови цитоскелету еукаріотичних клітин [313]. Один із них – білок *sopE*, який кодується однойменним геном та походить від помірнього бактеріофагу *SopEφ*. Останній відноситься до родини *Myoviridae* та має подібну будову до коліфагу P2 [311]. Вперше був виділений методом індукції мітоміцином C зі штаму *S. Typhimurium* DT204 [314].

Наявність такої комбінації генів та повного фагу в сальмонели, що показано у досліді індукції, свідчить про циркуляцію потенційно високопатогенних штамів нетифоїдних сальмонел, а це є фактором ризику спалахів зоонозів та подальшого їх розповсюдження. Матеріали розділу висвітлено у публікаціях [300; 315].

3.6. Розроблення системи діагностики сальмонельозу методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі

У загальній структурі патології птиці сальмонела має особливе значення, оскільки через високу антигенну різноманітність може викликати як спалахи захворюваності у господарствах, наслідком яких є високий падіж, так і субклінічний інфекційний процес [316]. При цьому значно знижується продуктивність птиці та відбувається контамінація м'яса та яєць [317].

Номенклатура антигенної структури сальмонел періодично оновлюється Референтним центром з дослідження сальмонел BOOЗ – WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Відповідно до останньої редакції, що була опублікована у 2007 році, рід *Salmonella* включає 2579 сероварів. Серед них 22 відносять до виду *bongori*, а 2557 – до виду *enterica*. [45]. Серовари виду *bongori* найчастіше виділяють від холоднокровних тварин, хоча вони також можуть бути збудниками сальмонельозу у ссавців та людей. Щодо інфікування птиці сальмонелами виду *bongori* у науковій літературі є мало даних, описані лише поодинокі випадки виділення сальмонел виду

bongori з курячих яєць та від синантропних птахів [318]. З цього можна зробити висновок, що *bongori* не має значного впливу на епізоотичних процес у птиці.

Серовари Pullorum та Gallinarum найчастіше викликають захворювання у курчат, індиків та фазанів, рідше – у перепелів, качок, цесарок та павичів [319]. Смертність може досягати 100 %. Це залежить в першу чергу від віку птиці, вгодованості, умов утримання та наявності супутніх інфекцій, оскільки відомо, що за несприятливих умов знижується резистентність сальмонелозів [7 – 8]. В Україні збудники пулорозу і тифу птиці досі є одними з найбільш поширених ізолятів сальмонел, які виділяють при моніторингу [320].

Серовари Enteritidis та Typhimurium є частково адаптованими збудниками. Викликають сальмонельоз у молодняку птиці, а в дорослого поголів'я перебігають субклінічно [13]. Однак у інфікованої дорослої птиці відмічають зниження продуктивності та інтенсивну колонізацію кишечника, внаслідок чого відбувається контамінація підстилки, кормів та води фекаліями, що містять сальмонелу [321].

Таким чином, небезпеку для птахівництва становлять як адаптовані серовари, які викликають системну інфекцію у птиці, так і неадаптовані – збудники хронічної інфекції. У першому випадку виникає висока смертність поголів'я птиці, зменшення продуктивності, що наносить значні економічні збитки. В першу чергу це витрати на протиепізоотичні заходи, що включають дезінфекцію, оновлення стад і вакцинацію. Адаптовані та частково адаптовані серовари становлять небезпеку насамперед для безпечності харчової продукції. Тому моніторинг епізоотичної ситуації в промислових господарствах є першою ланкою у процесі забезпечення ветеринарно-санітарного контролю.

Виділення чистої культури – еталонний метод діагностики бактеріальних інфекцій, який є основним, хоча і може доповнюватися імунологічними та молекулярно біологічними методами [13, 321; 329].

Початкові етапи бактеріологічної діагностики сальмонельозу завжди включають попереднє збагачення дослідного зразку на забуференій пептонній воді та селективне збагачення на середовищах, що пригнічують ріст бактерій *Proteus spp.* і грампозитивної мікрофлори. Після цього дослідні зразки культивують на селективних і диференційних хромогенних середовищах з наступним підтвердженням роду *Salmonella* та визначенням серовару у реакції аглютинації за схемою Вайта-Кауфмана [45].

Об'єктом дослідження були 12 штамів *S. enterica* з колекції НЦШМ та 45 польових штамів *Salmonella enterica* subsp. *enterica*: *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Virchow, 3 польових штами *Salmonella* Infantis, 4 *Salmonella* Gallinarum, 14 *Salmonella* Typhimurium та 21 *Salmonella* Enteritidis.

Для розрахунків було відібрано 97 повногеномних послідовностей з електронних баз даних: GenBank (Сполучені Штати Америки), EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека) та DDBJ (Японська база даних). Після вирівнювання та аналізу гомології нуклеотидних послідовностей було обрано можливі таргетні гени для ПЛР в реальному часі.

У якості таргетного гену для *Salmonella spp.* нами був обраний ген *invA*. Для ідентифікації серовару Enteritidis ми обрали ген *fliC*, який кодує джгутиковий антиген 1 фази, специфічний для даного серовару [273; 335 – 337]. Таргетним геном для ідентифікації серовару Enteritidis став ген гіпотетичного білка, що містить домен DUF1391. Специфічність фланкуючих праймерів перевіряли у програмі BLAST 2.0 (NCBI, Сполучені Штати Америки).

Облік та інтерпретацію результатів ПЛР-РЧ виконували за наявності або відсутності перетину кривої флуоресценції з встановленою на відповідному рівні пороговою лінією (C_t). Зразок вважали позитивним якщо значення C_t становило ≤ 38 , при відсутньому значенні C_t негативного контролю. Зразок вважали негативним, якщо значення C_t були відсутні.

Після оптимізації умов реакції, усі варіанти були перевірені на діагностичну специфічність, яку визначали за критерієм нездатності праймерів гібридизуватись з ДНК гетерологічних зразків, про що свідчила відсутність будь-яких значень у цих пробах при детекції флуоресценції на відповідному каналу. Специфічність складала 100 % (таблиця 3.8, рисунок 3.30).

У негативних зразках та зразках із сторонніми збудниками були відсутні значення порогового циклу C_t , а в позитивних зразках, що містили ДНК *Salmonella spp*, C_t не перевищувало встановлених меж для позитивного значення (≤ 38), що свідчить про специфічність щодо виявлення ДНК *Salmonella spp*. Реакцію проводили у трьох повторях та обчислювали стандартне відхилення (SD). У таблицях 3.8 і 3.10 наведено середнє значення C_t та SD.

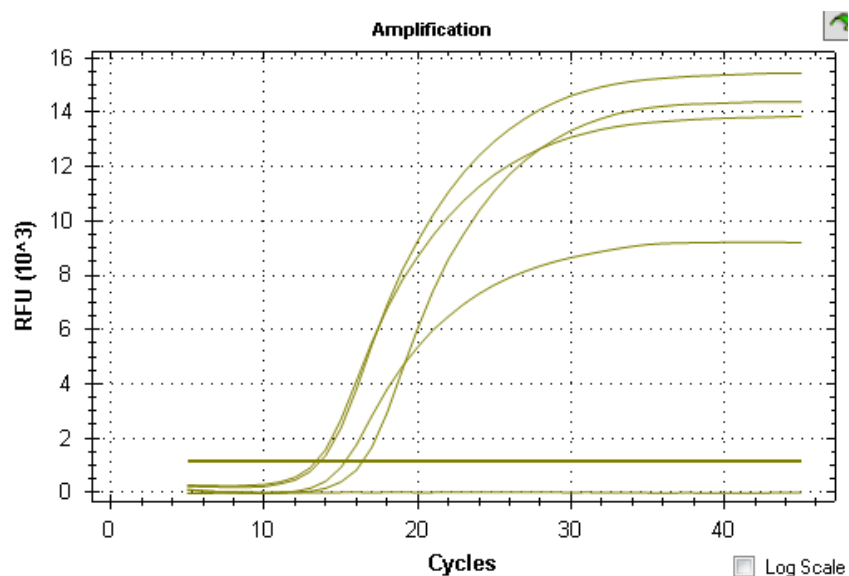


Рис. 3.30. Результат перевірки в ПЛР-РЧ праймерів, специфічних до *Salmonella spp*.

Аналітичну чутливість олігонуклеотидних праймерів dSsp-F/dSsp-R/ dSproba визначали шляхом 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*) (рис. 3.31).

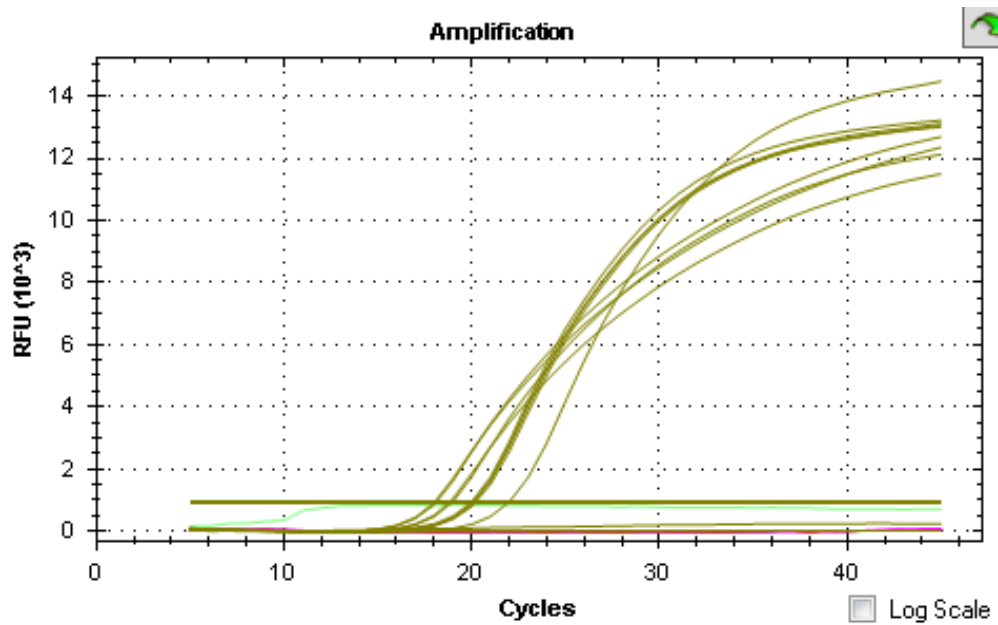


Рисунок 3.31. Перевірка в ПЛР-РЧ специфічності праймерів dSsp-F/dSsp-R/dSp-проба до різних сероварів бактерій роду *Salmonella*

Таблиця 3.8

Результати перевірки специфічності праймерів (за каналом FAM) до штамів *Salmonella enterica* різних сероварів та до гетерологічних зразків

Штам	Середнє значення Ct	SD	Результат, щодо наявності ДНК <i>Salmonella spp</i>
<i>S. Adabraka</i> 1	15,82	0,28	Позитивний
<i>S. Abortusovis</i> 372	16,25	0,23	Позитивний
<i>S. Typhimurium</i> 371	15,41	0,43	Позитивний
<i>S. Typhimurium</i> 144	15,44	0,43	Позитивний
<i>S. Typhimurium</i> B	16,15	0,15	Позитивний
<i>S. Typhimurium</i> 3	17,13	0,16	Позитивний
<i>S. Dublin</i> 373	16,15	0,21	Позитивний
<i>S. Enteritidis</i> P1	16,95	0,09	Позитивний

Таблиця 3.8. Продовження

Штам	Середнє значення Ct	SD	Результат, щодо наявності ДНК <i>Salmonella spp</i>
<i>S. Enteritidis</i> M	15,84	0,34	Позитивний
<i>S. Choleraesuis</i> 9	16,90	0,10	Позитивний
<i>S. Choleraesuis</i> 370	16,04	0,46	Позитивний
<i>S. Gallinarum</i> <i>Pullorum</i> K	17,88	0,30	Позитивний
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	Негативний
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	-	-	Негативний
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19112	-	-	Негативний
Негативний контроль	-	-	Негативний
<i>S. Enteritidis</i> DN1	16,17	0,08	Позитивний
<i>S. Enteritidis</i> DN3	17,10	0,11	Позитивний
<i>S. Enteritidis</i> N6	23,64	0,45	Позитивний
<i>S. Enteritidis</i> 2679	19,61	0,18	Позитивний
<i>S. Enteritidis</i> GT	16,28	0,46	Позитивний
<i>S. Enteritidis</i> 9	18,34	0,15	Позитивний
<i>S. Enteritidis</i> 15	19,06	0,05	Позитивний
<i>S. Enteritidis</i> G22	19,05	0,02	Позитивний
<i>S. Enteritidis</i> 10	25,25	0,07	Позитивний
<i>S. Enteritidis</i> K13	17,12	0,17	Позитивний
<i>S. Typhimurium</i> PN	15,55	0,27	Позитивний
<i>S. Typhimurium</i> 000173	16,87	0,42	Позитивний
<i>S. Typhimurium</i> 771	17,75	0,37	Позитивний
<i>S. Typhimurium</i> 16	14,79	0,35	Позитивний
<i>S. Typhimurium</i> VM1	18,75	0,44	Позитивний
<i>S. Typhimurium</i> VM2	17,19	0,16	Позитивний
<i>S. Typhimurium</i> VM3	17,98	0,07	Позитивний
<i>S. Typhimurium</i> VM4	15,97	0,12	Позитивний

Аналітичну чутливість олігонуклеотидних праймерів dSsp-F/dSsp-R/ dSproba визначали шляхом 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*) (рис.3.32).

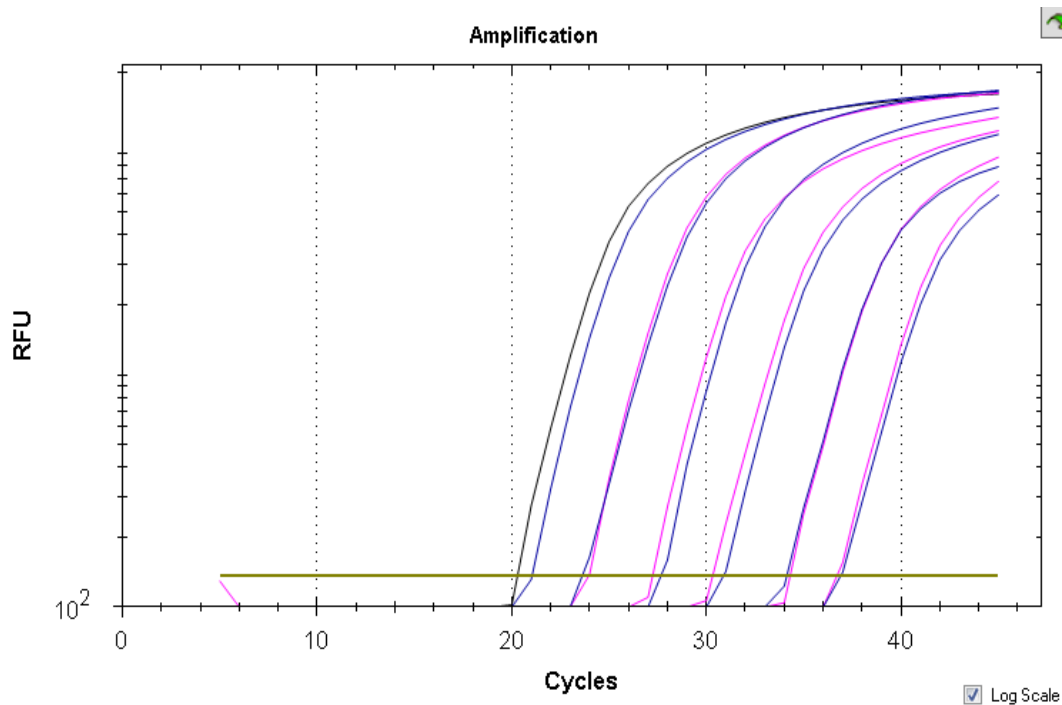


Рис. 3.32. Перевірка аналітичної чутливості праймерів dSsp-F/dSsp-R/ dS-proba до ДНК бактерій роду *Salmonella*

Межею виявлення (limit of detection, LOD) вважали останнє розведення ДНК, при якому спостерігається збільшення росту кривої флуоресценції, а отримане значення C_t по каналу FAM становить ≤ 38 .

Отримані результати свідчать, що аналітична чутливість праймерів dSsp-F/dSsp-R/dS-proba до ДНК бактерій роду *Salmonella* складає: для *S. Typhimurium* – 0,25 нг/зразок; для *S. Enteritidis* – 0,27 нг/зразок (таблиця 3.9).

З метою оцінки специфічності праймерів, що диференціюють серотипи *S. Enteritidis* і *S. Typhimurium*, були використані польові штами та штами НЦШМ. Як гетерологічні зразки були використані штами з колекції НЦШМ *E. Coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112. При необхідності праймери для *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* та *spp* можуть бути використані в мультиплексному варіанті ПЛР-РЧ, оскільки відрізняються за розміром фрагменту та не утворюють вторинних структур між собою. (рис. 3.33).

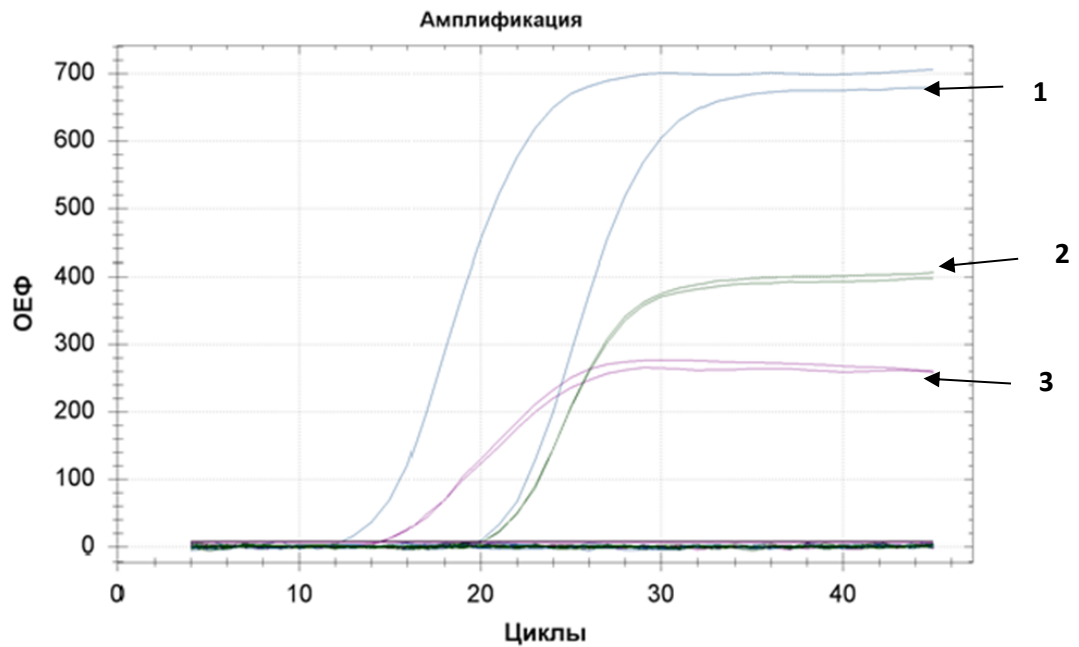


Рис. 3.33. Використання праймерів в мультиплексному варіанті ПЛР-РЧ.
Примітки: 1 – праймери для *Salmonella spp*; 2 – праймери для *S. Typhimurium*; 3 – праймери для *S. Enteritidis*

Таблиця 3.9

Визначення аналітичної чутливості праймерів до ДНК бактерій роду Salmonella

№	Розведення ДНК(<i>S. Typhimurium</i>)	Значення Ct за каналом FAM (<i>S. Typhimurium</i>)	Розведення ДНК (<i>S. Enteritidis</i>)	Значення Ct за каналом HEX (<i>S. Enteritidis</i>)
1	20,5 нг	21,03	27,0 нг	20,20
2	$1,0 \times 10^{-1}$	23,66	$1,0 \times 10^{-1}$	23,98
3	$1,0 \times 10^{-2}$	27,81	$1,0 \times 10^{-2}$	27,16
4	$1,0 \times 10^{-3}$	30,93	$1,0 \times 10^{-3}$	30,24
5	$1,0 \times 10^{-4}$	34,09	$1,0 \times 10^{-4}$	34,22
6	$1,0 \times 10^{-5}$	36,95	$1,0 \times 10^{-5}$	36,82
7	K _{Typh} (-)	-	K _{Ent} (-)	-

Визначення специфічності праймерів сероварів *S. Enteritidis* та *S. Typhimurium*

Зразок	FAM (<i>Salmonella spp</i>)		HEX (Enteritidis)		Cy5 (Typhimurium)	
	Ct середнє	SD	Ct середнє	SD	Ct середнє	SD
<i>S. Enteritidis</i> DN1	16,17	0,08	25,10	0,12	-	-
<i>S. Enteritidis</i> DN3	17,10	0,11	21,60	0,25	-	-
<i>S. Enteritidis</i> GT	16,28	0,46	30,47	0,26	-	-
<i>S. Enteritidis</i> 9	18,34	0,15	35,64	0,37	-	-
<i>S. Enteritidis</i> P81	18,86	0,23	21,50	0,47	-	-
<i>S. Enteritidis</i> 4v	35,03	0,15	33,85	0,18	-	-
<i>S. Gallinarum</i> 15	16,75	0,35	-	-	-	-
<i>S. Gallinarum</i> N1	15,99	0,38	-	-	-	-
<i>S. Gallinarum</i> 31	18,12	0,09	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i> PN	15,55	0,27	-	-	20,46667	0,352184
<i>S. Typhimurium</i> VM1	18,75	0,44	-	-	21,95667	0,295691
<i>S. Typhimurium</i> S1	18,96	0,19	-	-	37,45333	0,240069
<i>S. Typhimurium</i> L1	27,02	0,14	-	-	35,66	0,308058
<i>S. Typhimurium</i> Pg1	31,33	0,31	-	-	32,09	0,291033
<i>S. Enteritidis</i> L2	22,13	0,17	23,30	0,41	-	-
<i>S. Enteritidis</i> PN	18,87	0,36	29,07	0,10	-	-
<i>S. Enteritidis</i> K13	17,12	0,17	21,22	0,14	-	-
<i>S. Infantis</i> PN	22,74	0,48	-	-	-	-
<i>S. Virchow</i> L116	30,79	0,38	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i> 000173	16,87	0,42	-	-	31,12	31,17
<i>S. Typhimurium</i> 771	17,75	0,37	-	-	33,15	34,01
<i>S. Typhimurium</i> 16	14,79	0,35	-	-	26,24	26,22

Метод полімеразної ланцюгової реакції є дуже перспективним у лабораторній діагностиці бактеріальних інфекцій. Зокрема через швидкість отримання результатів та високу чутливість методу. ПЛР використовується не лише для

ідентифікації геному збудника, але, в деякий випадках, і для підтвердження результатів виділення чистої культури бактеріологічним методом та для диференціації вакцинних і польових штамів [215–217]. Залежно від мети і задач використовують різні модифікації, найчастіше – полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі.

У даному дослідженні проводилося підтвердження роду *Salmonella* та сероварів *Enteritidis* та *Typhimurium* у ПЛР-РЧ. Було встановлено, що специфічність даного набору праймерів становить 100 %. Окрім того дані праймери можуть бути використані також і в мультиплексному варіанті, що дозволяє одночасно проводити ідентифікацію роду *Salmonella*, а також сероварів *Enteritidis* та *Typhimurium*.

Дані серовари є одними з найбільш поширених. В Україні протягом 2015 – 2018 років їхня частка становила 35,2 % серед усіх сальмонел, виділених з біологічного та патологічного матеріалу тварин і птиці [23]. Варто зазначити, що ці серовари відносять до неадаптованих, оскільки вони є патогенними для різних видів, зокрема у дорослого поголів'я птиці інфекція перебігає безсимптомно та спричиняє трансоваріальне інфікування [57]. За даними EFSA серовар *Enteritidis* є домінуючим у стадах несучок, і його відсоток зростає з 2016 [108–111]. У 2017 захворюваність серед людей зросла до 91662 випадків, серед яких у 36,8% інфекція була спричинена споживанням курячих яєць [111]. Тому існує необхідність ретельного контролю циркуляції нетифоїдних сероварів у птахівництві для безпеки харчової продукції. Матеріали розділу висвітлено у публікації [338]

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Сальмонельоз птиці – одна із найбільших проблем птахівництва, яка спричиняє загибель поголів'я птиці та контамінацію продукції птахівництва сальмонелами [339–341]. Найбільше значення має вид *Salmonella enterica* та нетифоїдні серовари підвиду *enterica*: Gallinarum, Pullorum, Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Virchow, оскільки є найпоширенішими серед свійської та дикої птиці. Серовари Gallinarum/Pullorum викликають системну інфекцію у птиці, оскільки є адаптованими [342–343]. В той час як інші нетифоїдні серовари вражають переважно молодняк, а в дорослого поголів'я викликають хронічну інфекцію із субклінічним перебігом, що призводить до виділення збудника в навколишнє середовище та ураження здорової птиці, яка утримується в господарстві.

Пулороз і тиф, збудником яких є серовари Gallinarum та Pullorum, поширені головним чином в країнах, де відбувається інтенсивний розвиток птахівництва [345]. Хоча до Gallinarum головним чином сприйнятлива доросла птиця, даний серовар здатен викликати септицемію у птиці всіх вікових груп. В той час як серовар Pullorum уражає здебільшого молодняк [346]. Gallinarum та Pullorum є високопатогенними для птиці і спричиняють загибель до 80% поголів'я [347]. Варто зазначити, що відповідно до останнього видання схеми Вайта-Кауффмана, яка визначає антигенну структуру сальмонел, серовари Gallinarum та Pullorum об'єднані в один серовар [45]. Через ідентичну антигенну структуру та неможливість диференціювати ці серовари методом серотипування, Pullorum визначають як біовар серовару Gallinarum [45]. У Gallinarum не відбувається декарбоксилювання орнітину та розщеплення глюкози з утворенням газу. Біохімічні відмінності серовару Pullorum виявляються у нездатності зброджувати дульцитол та слабкій або відсутній ферментації мальтози [348]. Також можлива диференціація Gallinarum та Pullorum методом полімеразної ланцюгової реакції [349].

Протягом останніх 30 років, поширення збудників пулорозу й тифу значно скоротилося і багато країн повідомляють про відсутність хвороби в популяції свійської птиці. У Сполучених Штатах Америки реєструють окремі випадки ізолювання *Pullorum* переважно від птиці домашнього утримання. Останній випадок тифу, виликаного *Gallinarum* зареєстровано у 1981 році [293]. Схожу ситуацію спостерігають і в країнах Західної Європи, відмічаючи при цьому, що причиною стійкої циркуляції *Pullorum* є тенденція до збільшення об'ємів птахівництва з вигульним утриманням птиці, при яких є небезпека передачі збудника від дикої птиці та векторна передача [350].

Решта нетифоїдних сероварів викликає хронічну інфекцію у дорослої птиці, яка перебігає безсимптомно. В Європі найбільш поширеними серед ізолятів, що виділяють від тварин та харчових продуктів є *Infantis*, *Typhimurium*, *Enteritidis* та *Newport* [108–111]. Ці ж серовари переважають і серед ізолятів, виділених від людей. При цьому близько 80% серед них становлять *Enteritidis* та *Typhimurium*. Встановлено, що у 2017 році найбільша кількість випадків сальмонельозу – 31,3% виникла внаслідок споживання курячих яєць. Протягом 2016–2017 років зареєстровано великий спалах сальмонельозу, спричиненого сероваром *Enteritidis*, який охопив 14 країн Європейського Союзу [351]. В окремі роки фіксували переважання в тварин окремих сероварів, таких як *Mbandaka*, *Agona*, *Derby*, *Infantis*. Проте циркуляція *Enteritidis* та *Typhimurium* (а також його монофазного варіанту) зберігалася на високому рівні протягом 2005–2017 років [108–111].

Аналіз динаміки розповсюдженості сальмонельозу птиці з кожним роком показує поступове зниження кількості сальмонел, виділених у ході моніторингових досліджень та під час спалахів сальмонельозу. Зростання кількості виділених сальмонел зафіксовано лише у 2009 році – 900 виділених зразків, порівняно з 765 у 2008. Однак у цілому поширення сальмонельозу в Україні поступово зменшується: з 2006 по 2019 рік. У 2019 зафіксовано лише 94 випадки виявлення бактерій роду *Salmonella* за результатами бактеріологічних досліджень біологічного та патологічного матеріалу тварин

та птиці, а також сировини тваринного походження, харчових продуктів та кормів. При цьому при дослідженні біологічного та патологічного матеріалу, від птиці було виділено 90% культур: із загальної кількості 40 ізолятів – 36 походили від птиці. З них 69,4% відносились до серовару *Gallinarum* або його біовару *Pullorum*. Однак при дослідженні кормів, сировини тваринного походження та харчових продуктів основна маса виділених ізолятів відносились до інших нетифоїдних сероварів – *Enteritidis* та серовари групи С: субпродукти та м'ясо птиці, а також напівфабрикати. Варто зазначити, що за результатами досліджень біологічного та патологічного матеріалу основними носіями сальмонел у птахогосподарствах є кури-несучки (сальмонели виділяли з яйцепроводів загиблої птиці та з посліду в період відкладання яєць) та бройлери (джерелом сальмонел була підстилка з ящиків для транспортування добових курчат) і продукти їх забою. Ці дані ще раз підтверджують тезу про колонізацію кишечника птиці та передачу інфекції через репродуктивну систему, а також про те, що джерелом сальмонельозу в благополучному господарстві є добові курчата, заражені вертикальним шляхом.

Щодо попередніх років спостерігається аналогічна ситуація. Хоча у 2018 році від племінних стад качок виділено значну кількість сальмонел груп С (зокрема *Infantis*) і В з підстилки ящиків для транспортування та на інкубаційних станціях, що може свідчити про занесення інфекції у господарства з інфікованими добовими каченятами. В інші роки кількість сальмонел виділених від качок є незначною, порівняно з племінними стадами курей-несучок та бройлерів. Також велику кількість ізолятів *Infantis* було виділено при дослідженні фаршу та ММО птиці у 2015 році. Однак домінуючими сероварами у період 2006 – 2019 рр. все-таки залишались серовари *Gallinarum/Pullorum*, *Enteritidis* та *Typhimurium*.

У даному дослідженні об'єктом були ізоляти *Salmonella enterica*, виділені від птиці та на території птахогосподарств. За результатами серологічного типування, більша частина ізолятів належала до серовару

Enteritidis. Дещо менше було ізолятів Typhimurium. Також серед ізолятів було виявлено серовар Gallinarum/Pullorum, що прямо корелює і з даними щодо моніторингу в Україні, і з тезою про розповсюдження даного серовару/біовару в країнах з активним розвитком птахівництва.

З огляду на вищенаведені дані моніторинг сальмонельозу є ефективним заходом, проте не дозволяє досягти повного вивільнення популяції свійської птиці від збудника. Однією з причин, яка сприяє ускладнює цей процес є зростання антибіотикорезистентності серед бактерій, яка спричинена здебільшого інтенсивним використанням антибактеріальних препаратів.

Більшість випадків нетифоїдного сальмонельозу не потребують застосування антибіотиків, оскільки інфекція є самообмежуючою, а збудник персистує у клітинах епітелію тонкого кишечника, викликаючи гастроентерити [352]. В окремих випадках сальмонели можуть спричиняти інвазивну інфекцію, наслідком якої є бактеріємія або менінгіт [353]. Зростання частоти виявлення штамів збудника, резистентних до даних класів антибіотиків, описано в науковій літературі останніх років та відображено у звітах систем нагляду за антибіотикорезистентністю: GLASS, EFSA, ECDC, CDC.

За даними звітів EFSA з 2011 по 2016 роки, резистентність сальмонел, виділених з м'яса бройлерів і курей-несучок, а також з проб, відібраних у стадах бройлерів, до налідиксової кислоти коливався на рівні 48 %. Лише у 2013 та 2016 роках становив 65,8 та 61,5 % відповідно [108–111]. У той же час ізоляти *Salmonella spp.*, виділені від людей у 2013 році проявляли значно нижчу резистентність до налідиксової кислоти – 14,4 %. Даний препарат є першим у групі хінолонів та впроваджений у клінічну практику в 1964 році [354]. Ентеробактерії досить швидко розвинули здатність виявляти резистентність до хінолонів. Найпершим препаратом цього класу була налідиксова кислота, яку синтезували у 1962 році [355]. Однак у 1987 зафіксовано два незалежних один від одного випадки інфікування штамми *Salmonella* Typhimurium, що у ході лікування виявились резистентними до

ципрофлуксацину [356–357]. Сальмонели, резистентні до хінолонів також можуть мати перехресну резистентність до хлорамфеніколу і тетрацикліну [358].

У даному дослідженні ізоляти проявляли найбільшу резистентність до налідиксової кислоти (препарат класу хінолонів) та цефоперазону (цефалоспорини 3 покоління): 40 резистентних ізолятів з 57 досліджених, що складає 70%. В цілому це було очікуваним результатом, оскільки ізоляти, що виділені від свійської птиці завжди мають значно вищу резистентність до цих двох класів, порівняно з ізолятами сальмонели іншого походження. Варто звернути увагу, що ізоляти, резистентні до налідиксової кислоти і цефоперазону домінують як серед ізолятів *Enteritidis* (77,2 % - 17/22), так і *Typhimurium*.

Серед досліджених ізолятів виявили декілька фенотипів, що формували резистентність одразу до кількох препаратів різних класів: 8 ізолятів проявляли резистентність до бета-лактамів (ампіцилін, цефоперазон, цефтазидим, цефтриаксон) і тетрациклінів (тетрациклін). Ізоляти у кількості 5: 3 *Enteritidis* та 2 *Typhimurium* також проявляли резистентність до цих препаратів та додатково до доксицикліну.

Також було виявлено дві підгрупи ізоляти (по три в кожній), де фенотип був таким, як і в попередній, але додатково доповнювався резистентністю до стрептоміцину в першій підгрупі та до гентаміцину в другій.

Фенотип одночасної резистентності до бета-лактамів (ампіцилін, цефтриаксон), тетрацикліну, стрептоміцину та хінолонів (налідиксова кислота, ципрофлуксацин) демонстрували три ізоляти *S. Enteritidis*. Необхідно звернути увагу на те, що ці ізоляти були виділені у двох різних регіонах. Найімовірніше, що вони є ізолятами одного і того ж штаму. Проте не виключено, що такий фенотип може бути розповсюдженим і серед різних штамів одного серовару.

Всесвітня системи нагляду GLASS відмічає різке зростання випадків нетифоїдного сальмонельозу до 94 мільйонів випадків щороку та визначає

резистентність до фторхінолонів як основну загрозу [359]. Чутливість сальмонел до фторхінолонів є варіабельною і залежить від джерела виділення культури. Станом на 2013 рік, від 35 до 49 % ізолятів *Salmonella* в деяких країнах Африки та Східного регіону середземноморського узбережжя були резистентними до фторхінолонів, тоді як у країнах Центральної Америки – 96 % ізолятів [360]. У звітах EFSA, які містять інформацію щодо антимікробної чутливості сальмонел із 22 країн Європи, наведено результати тестування ізолятів, виділених від різних видів тварин та від людини. Найвищий рівень резистентності виявляли у ізолятів, отриманих від стад бройлерів, а також м'яса бройлерів, курей-несучок та м'яса індички – на рівні 48 – 57 % для налідиксової кислоти та ципрофлоксацину. В окремі роки процент збільшувався відповідно до 65, 8 – 68 % (2013 рік). В той час як резистентність у ізолятів від свиней та ВРХ зберігалась на рівні 1 – 4 %. Серед ізолятів виділених від людей резистентність до хінолонів виявляли у 14-15 % протягом 2011 – 2013 років, у 20 % в 2014 %. У наступні кілька років цей показник зменшився до 12 %.

Оскільки мішенню хінолонів є ДНК-топоізомерази (безпосередньо гірази у грамнегативних бактерій), результатом їх застосування є порушення реплікації хромосомальної ДНК бактерій. Тому резистентність до налідиксової кислоти пов'язують із накопиченням мутацій у генах-регуляторах ДНК-топоізомерази 4 та ДНК-гірази [361]. Ще один механізм резистентності, який полягає у зміні проникності поринів у складі клітинної мембрани бактерії досягається шляхом накопичення мутації у генах білку OmpF, які також мають хромосомну локалізацію.

До 90-х років 20 століття резистентність до хінолонів залишалася низькою, до виявлення у Фінляндії впродовж 1998 – 2003 років ізолятів *Salmonella enterica* з Південно-Східної Азії, які виявляли стійку резистентність до налідиксової кислоти та знижену – до ципрофлоксацину [362]. Аналіз нуклеотидної послідовності ізолятів не виявив хромосомної мутації у специфічній ділянці QRDR (quinolone resistance-determining region) гену *gyrA*.

Останній кодує субодиницю ДНК-гірази ентеробактерій, є гомологічним гену субодиниці ParC топоізомерази 4 (одна із мішеней хінолонів) та локалізується на ділянці QRDR [363].

Відносно нове дослідження клінічних ізолятів ентеробактерій у Польщі виявили комбінацію хромосомних мутацій QRDR та плазмідні детермінанти резистентності – AAC(6')-Ib-cr, QepA та білки родини *Qnr* у *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* та *Enterobacter cloacae* [364].

Вперше плазмідні детермінанти резистентності до хінолонів PMQR виявили у *Klebsiella pneumoniae* у 1998 році у складні кон'югативної плазміді, у *Salmonella spp.* – [365–366]. На сьогодні відомо, що серед сальмонел дуже часто зустрічаються білки QnrS та QnrD, які запобігають зв'язуванню топоізомераз із фторхінолонами.

У даному дослідженні 80,7 % ізолятів *Salmonella enterica*, що були виділені у стадах бройлерів та курей-несучок були резистентними до ципрофлоксацину, а 70,1% - до налідиксової кислоти. При цьому 4 ізоляти *S. Enteritidis*, 2 ізоляти з невизначеним серотипом, один ізолят Nadar та один Gallinarum виявили помірну чутливість до даного антибіотику. Термін «помірна чутливість» (In) є досить неоднозначним та іноді невірно трактується. Варто зазначити, що у системі оцінки чутливості EUCAST відсутні критерії та розміри зон затримки, що відповідали б помірній чутливості. У стандарті CLSI вказано порогові значення, які відповідають такому рівню чутливості. Перш за все термін має на меті запобігти можливим розбіжностям в інтерпретації, особливо у випадку препаратів із широкими межами фармакотоксичності [367]. Окрім цього помірно чутливими вважають ізоляти, у яких мінімальна пригнічувальна концентрація антибіотику передбачає клінічну ефективність в органах та частинах тіла, де він досягає фізіологічних концентрацій. Або ж препарат може бути застосований у вищих дозах, ніж зазвичай. У нашому дослідженні невелика кількість ізолятів проявляла помірну чутливість: 3 ізоляти – до препаратів класу фторхінолонів: цефтриаксону та цефтазидиму. Однак лише один ізолят був помірно чутливим

до цефоперазону. Аналогічну ситуацію спостерігали щодо тетрациклінів: 1 помірно чутливий до тетрацикліну, 6 – до доксицикліну. Враховуючи те, що обидва препарати відносяться до одного класу і резистентність до одного препарату відображає резистентність до всього класу, можна припустити, що 6 помірночутливих до доксицикліну ізолятів є в цілому стійкими до всіх тетрациклінів.

Варто зазначити, що проблема антибіотикорезистентності сальмонел не обмежується хворобами, які викликає цей збудник. Оскільки резистентні штами сальмонел можуть бути джерелом генів антибіотикорезистентності для інших видів. Особливо це стосується бактерій родини *Enterobacteriaceae*.

В цьому аспекті, на нашу думку, важливим є чутливість дикої птиці до антибіактеріальних препаратів, оскільки вона є природним резервуаром збудника в природі. У науковій літературі приведено результати досліджень ізолятів дикої водоплавної птиці на півдні України, що були резистентними до тетрациклінів, гентаміцину та стрептоміцину [368].

Широка розповсюдженість плазмідних факторів резистентності до хінолонів, а також здатність бактерій до міжвидового обміну позахромосомними генетичними елементами створює загрозу для громадського здоров'я, оскільки хінолони є основними препаратами для лікування системних інфекцій спричинених нетифоїдними сальмонелами у осіб з імунodefіцитом та дітей, а також для лікування черевного тифу. А ципрофлоксацин є терапією першої лінії у лікуванні інвазивного сальмонельозу [108].

Серед досліджених ізолятів серовару *Typhimurium* одночасно резистентними до ципрофлоксацину, тетрацикліну та хлорамфеніколу були 2 ізоляти. Ще дві культури були резистентними до ципрофлоксацину та хлорамфеніколу і помірно чутливими до доксицикліну (але чутливими до тетрацикліну).

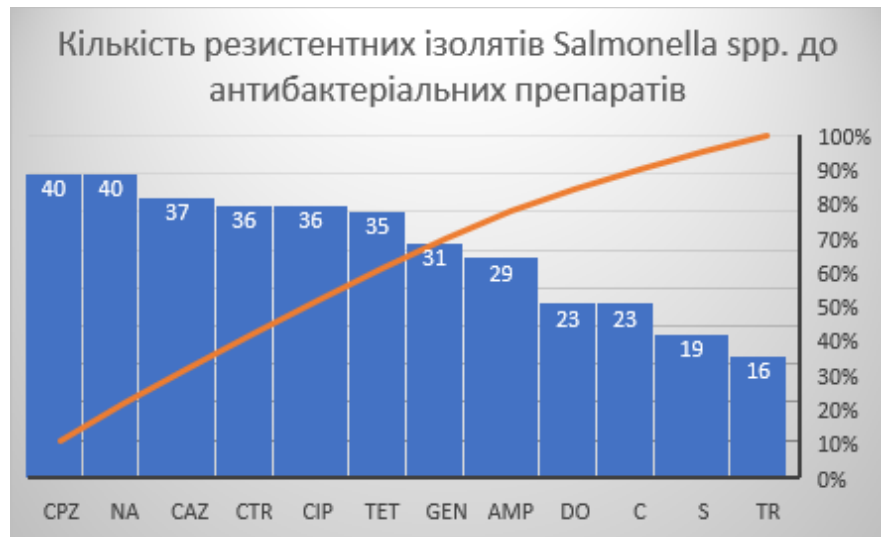


Рис. 4.1. Кількість ізолятів *Salmonella* spp., резистентних до антибактеріальних препаратів

Позначення: CPZ – цефоперазон, NA – налідиксова кислота, CAZ – цефтриазидим, CTR -цефтриаксон, CIP – ципрофлоксацин, ТЕТ – тетрациклін, GEN – гентаміцин, AMP – ампіцилін, DO – доксициклін, С – хлорамфенікол, S – стрептоміцин, TR – триметоприм.

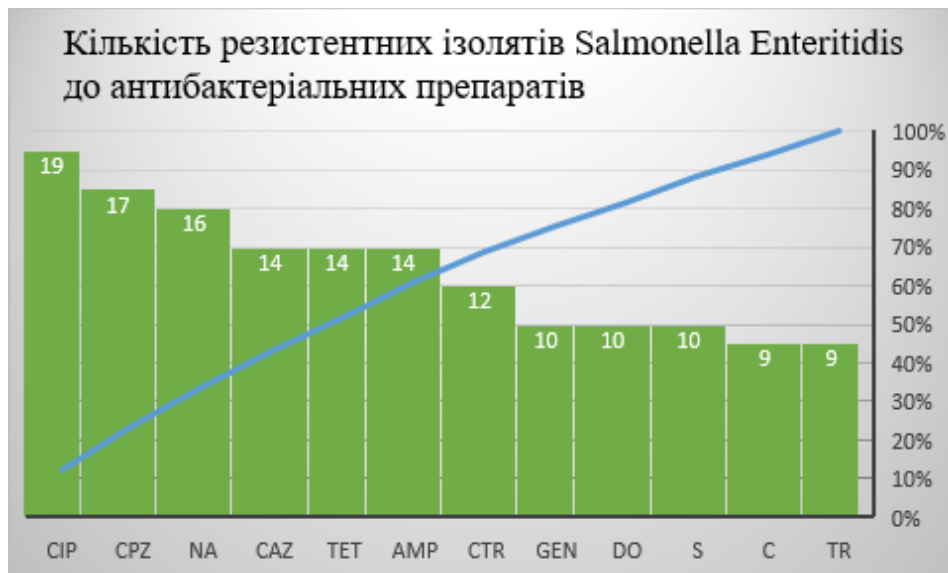


Рис. 4.2. Кількість ізолятів *Salmonella* Enteritidis, резистентних до антибактеріальних препаратів

Позначення: CPZ – цефоперазон, NA – налідиксова кислота, CAZ – цефтриазидим, CTR -цефтриаксон, CIP – ципрофлоксацин, ТЕТ – тетрациклін, GEN – гентаміцин, AMP – ампіцилін, DO – доксициклін, С – хлорамфенікол, S – стрептоміцин, TR – триметоприм.

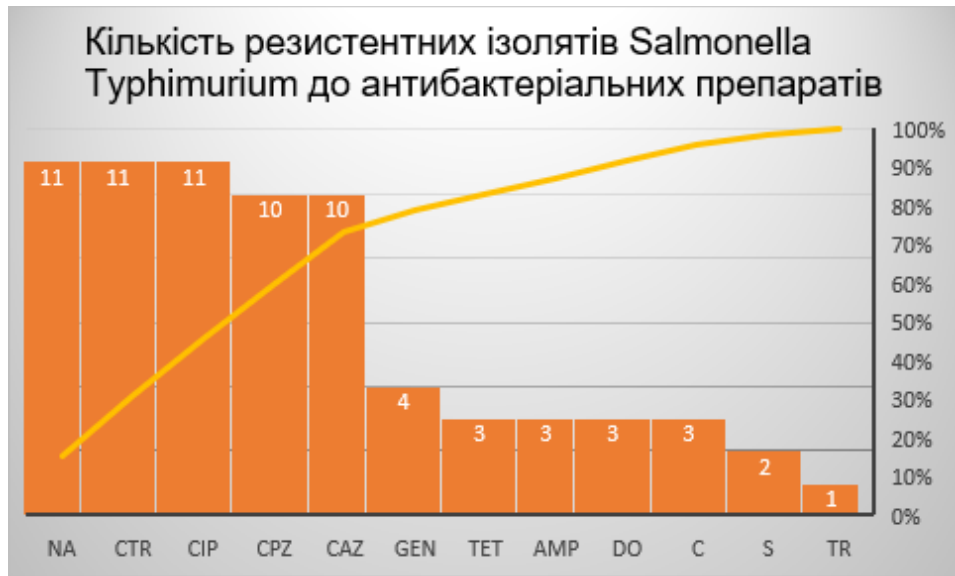


Рис. 4.3. Кількість ізолятів *Salmonella* Typhimurium, резистентних до антибактеріальних препаратів

Позначення: CPZ – цефоперазон, NA – налідиксова кислота, CAZ – цефтріазидим, CTR - цефтриаксон, CIP – ципрофлоксацин, ТЕТ – тетрациклін, GEN – гентаміцин, AMP – ампіцилін, DO – доксициклін, С – хлорамфенікол, S – стрептоміцин, TR – триметоприм.

Таблиця 4.1

Фенотиповий прояв антибіотикорезистентності у ізолятів

Фенотип антибіотикорезистентності	Enteritidis	Typhimurium	Решта
AMP+CPZ+CTR+CAZ+TET	5	3	1
AMP+CPZ+CTR+CAZ+TET+DO	3	2	
AMP+CPZ+CTR+CAZ+TET+DO+S	2	1	
AMP+CPZ+CTR+CAZ+TET+DO+GEN	2	1	
AMP+CTR+TET+S+NA+CIP	2		
CTR+NA+CIP	7	5	6

Позначення: CPZ – цефоперазон, NA – налідиксова кислота, CAZ – цефтріазидим, CTR - цефтриаксон, CIP – ципрофлоксацин, ТЕТ – тетрациклін, GEN – гентаміцин, AMP – ампіцилін, DO – доксициклін, С – хлорамфенікол, S – стрептоміцин, TR – триметоприм.

Моніторинг чутливості сальмонел, виділених зі зразків м'яса бройлерів та курей-несучок в Європі протягом 2011–2017 років показав досить високий рівень резистентності ізолятів до тетрацикліну [368–370]. Найвищий показник було зафіксовано у 2013 році: 54 % ізолятів з м'яса бройлерів та 51,6 – індики. Решта часу резистентність до тетрацикліну зберігалася на рівні 40 – 43 %. Аналогічні дослідження ізолятів *Salmonella enterica*, виділених у людей, показали менший відсоток резистентності – 27–30 %. Зростання резистентності до тетрациклінів також відмічено в інших регіонах, зокрема у країнах Африки, в Туреччині, Південній Азії [371–374]. До цефалоспоринів 3 покоління EFSA визначає відносно низький рівень резистентності, який у ізолятах від птиці має тенденцію до зниження – 3,3 % у 2011, 10,1 % у 2013 та 2,6 % і 0,8 % у ізолятів, виділених з м'яса бройлерів та у стадах відповідно [375–376]. Однак останні наукові публікації відмічають зростання резистентності сальмонел до цефалоспоринів та фторхінолонів [377–378].

У даному дослідженні резистентними до цефалоспоринів 3 покоління були більше половини ізолятів. Зокрема, шість ізолятів Enteritidis, 7 ізолятів Turphimurium та 7 не типованих проявляли стійку резистентність до трьох препаратів підкласу одночасно.

Попри те, що резистентність до антибактеріальних препаратів серед бактерій зберігається на досить високому рівні та має тенденцію до зростання, результати тестування чутливості залежать також і від стандарту, за яким оцінюється чутливість. EFSA звертає увагу, що результати, отримані з використанням CLSI та EUCAST дещо відрізняються. Також деякі дослідники вважають диск-дифузію та MIC не достатньо точними тестами, порівняно з методом розведень [379].

З огляду на отримані результати, серед свійської птиці в Україні циркулюють штами сальмонел, що проявляють високу резистентність до антибактеріальних препаратів класів хінолонів та цефалоспоринів. Даний факт становить загрозу не лише благополуччю галузі птахівництва, але в першу чергу говорить про загрозу розповсюдження резистентності. Оскільки

доведено, що антибіотикорезистентність може передаватись не лише в межах бактеріальних популяцій сальмонели, а й іншим видам. Зокрема, як було зазначено вище, у клінічній практиці дедалі частіше фіксують випадки набуття збудником резистентності від представників нормальної та умовно-патогенної флори макроорганізму в процесі лікування. Оскільки високу резистентність та мультирезистентність збудників бактеріальних інфекцій реєструють у всьому світі, існує потреба постійного моніторингу чутливості бактерій до антибактеріальних препаратів.

Також відмічено резистентність до тетрациклінів – на рівні 20–63 %, що варіюється залежно від серотипу. Найвищу резистентність виявляли ізоляти серотипу *S. Enteritidis*, який є найбільш розповсюдженим збудником нетифоїдного сальмонельозу. Оскільки тетрацикліни у багатьох країнах широко використовуються у якості промоторів росту, існує небезпека розповсюдження резистентності до цього класу шляхом транскордонного розповсюдження резистентних бактерій. При цьому у 20 % ізолятів, залучених у дане дослідження, виявлено одночасну резистентність до ампіциліну і цефтриаксону. Серед них значна кількість, окрім ампіциліну, тетрацикліну і цефтриаксону, резистентна також до аміноглікозидів. Це значно звужує можливості для лікування інфекцій, що можуть бути спричинені такими штамами та створює ризик набуття подібного фенотипу збудниками інших бактеріальних захворювань.

Висока варіабельність резистентності до тетрацикліну відмічена у звітах EFSA: в 2016 частка резистентних до тетрацикліну ізолятів сальмонел, виділених від людей, становила 29,2 %, у 2017 – 30,2 %. У ізолятів сальмонел від бройлерів резистентність до тетрацикліну становила 46,1 %, від індичок – 59,3 % [369–370].

Отримані результати підтверджують циркуляцію в Україні сальмонел, резистентних до класів антибіотиків, які є першою лінією терапії при лікуванні інфекцій, збудниками яких є нетифоїдні сальмонели. Окрім того, було виявлено 6 різних фенотипів, які показують резистентність одночасно до

кількох різних класів. При аналізі резистентності ізолятів, що відносились до сероварів *Enteritidis* та *Typhimurium* відмічено різний відсоток резистентних ізолятів до конкретних препаратів, але спільною рисою була висока резистентність до хінолонів та цефалоспоринів 3 покоління (бета-лактами). Лише незначна кількість ізолятів була резистентною до триметоприму, хлорамфеніколу та аміноглікозидів.

Результати аналізу даних лабораторних досліджень в Україні, здійснених за програмою Контролю сальмонельозу свідчать про значне поширення сальмонели як серед птиці, так і в харчових продуктах та сировині тваринного походження. Зокрема, серед птиці найбільш поширеними є адаптовані до птиці серовар *Gallinarum* та його біовар *Pullorum*. Це спричинено інтенсифікацією та розширенням галузі птахівництва в Україні. Найбільшу кількість сальмонел виділяють від курей-несучок та в зоні інкубатора: з меконію, яєць, ембріонів, підстилки. Це свідчить саме про значну поширеність хронічної інфекції у птиці, наслідком якої є зараження оепродуктивної системи. В результаті яйця інфікуються та стають джерелом сальмонельозу. Також значний відсоток сальмонел виділяють зі столових яєць. При цьому в усіх випадках домінуючим сероваром є *Enteritidis*.

Застосування молекулярно-генетичних методів дозволило з'ясувати механізми резистентності до антибактеріальних препаратів. В першу чергу було встановлено, що гени антибіотикорезистентності локалізуються здебільшого на плазмідах, транспозонах, інтегронах. Всі ці елементи є позахромосомними і можуть розповсюджуватися автономно. Зокрема, основним механізмом розповсюдження резистентності є горизонтальне перенесення генів, яке дозволяє бактеріям як обмінюватися генами всередині виду, так і передавати їх від одного виду – іншому.

Розвиток молекулярної біології та впровадження в практику методу полімеразної ланцюгової реакції дозволили виявити у сальмонел генетичні механізми розвитку інфекційного процесу, зокрема групи генів, що кодують фактори колонізації, адгезії, інвазії та персистенції в організмі ссавців та птиці.

Дослідженнями Galan та Curtiss було встановлено наявність у *S. Typhimurium* оперону *invABC*, який зумовлює здатність бактерії проникати в ентероцити [371–373]. Згодом було підтверджено, що оперон *invABC* наявний в усіх сальмонел та є консервативним, а отже ідентичним у всіх бактерій роду *Salmonella* [374]. Також було встановлено, що оперон *invABC* був відсутнім у штаму *S. arizonae*, який був нездатним до інвазії [375]. У 2019 році було опубліковано повногеномну послідовність штаму *S. Senftenberg*, виділеного з пір'яного білкового концентрату. Аналіз отриманої послідовності показав відсутність гену *invA*, а також хромосомного острову патогенності SPI-1, що дозволяє говорити про нездатність штаму здійснювати інвазію та, відповідно, про нездатність викликати інфекцію [376]. Аналогічну відсутність SPI-1 та гену інвазії у штаму *S. Senftenberg* було встановлено при ізолюванні бактерії з кокосової стружки [377]. Однак у дослідженні 134 ізолятів *S. Senftenberg* в 2011 році у Франції, які були виділені в інкубаторіях, на птихофабриках та у випадках тяжкого перебігу сальмонельозу в людей, встановили наявність гену *invA*, попри відсутній хромосомний локус SPI-1 [378]. На нашу думку, такі дані є підтвердженням патогенності бактерій для птиці та ссавців за наявності гену *invA*, оскільки проникнення в нефагоцитуючі клітини є здатності бактерій проникати в ентероцити та здійснювати персистенцію в кишечнику птиці та ссавців за наявності гену *invA*.

Ген *invA* ідентифікують у 100% випадків при виділенні ізолятів від водоплавної та дикої птиці [379–382].

Ключове значення гену *invA* для патогенності сальмонели зумовило використання його нуклеотидної послідовності у якості універсальної мішені для ідентифікації роду *Salmonella* в полімеразній ланцюговій реакції як з дослідною метою, так і в комерційних діагностичних тест—системах.

На сьогодні ген *invA* є стандартною мішенню для ідентифікації генетичного матеріалу сальмонел та використовується в більшості діагностичних тест-систем [383].

Проведені нами дослідження підтвердили наявність гену *invA* в усіх досліджених ізолятах та у музейних штаммах, що дозволяє говорити про їхню патогенність для всіх видів тварин та людини, а також для птиці. Інвазія в клітини тонкого кишечника дорослої птиці призводить до хронічної інфекції та виділення збудника у навколишнє середовище, що призводить до контамінації кормів, води, яєчної шкаралупи та здорового поголів'я. Також колонізація кишечника птиці призводить до контамінації м'ясної продукції птахівництва.

На початкових етапах інфекційного процесу сальмонельозу важливу роль відіграють фактори адгезії, які представлені полімерними білковими структурами – джугитками та пілями.

У всіх сероварів сальмонел інфекційний процес починається з адгезії до апікальних мембран ентероцитів та М-клітин у тонкому кишечнику [384]. Необхідним елементом для здійснення адгезії є фімбрії. Адгезивний апарат організовано у вигляді кластерів по 4–15 генів, в складі кожного є гени регуляторних білків та структурні [385]. Деякі типи фімбрій є специфічними для окремих сероварів. Так, для серовару *Enteritidis* специфічними є тонкі агрегативні фімбрії типу SEF14, що які беруть участь у формуванні біоплівки [386]. Ген *sefA*, що кодує фімбріальний антиген, широко використовується в молекулярній діагностиці для диференціації сальмонел, що належать до серовару *Salmonella Enteritidis* [387]. В той час, як ген *agfB* було виявлено у всіх досліджених ізолятів. Фімбріальний генний кластер *agfABC* є консервативним для всієї родини *Enterobacteriaceae* та включає основні три гени: *agfA* – велика субодиниця, *agfB* – білок-нуклеатор та *agfC* – оксидоредуктаза [388]. Ще одним консервативним геном, але вже для роду *Salmonella*, є ген *invA*. Останній разом із 16S РНК використовується для ідентифікації сальмонел [389].

Значне розповсюдження сальмонел пов'язане із високою антигенною різноманітністю та значною генетичною мінливістю. Це досягається, в першу чергу, завдяки здатності до набуття генів шляхом горизонтального переносу

[390]. Значну роль в цьому процесі відіграють плазмиди – позахромосомні молекули ДНК. Вони можуть нести гени вірулентності та резистентності до антибактеріальних препаратів.

Для класифікації плазмід розроблено схему, що базується на відмінностях механізму реплікації. Виявлено, що плазмиди з одним типом реплікації є не сумісними, тобто не здатними до співіснування в межах одного клону [391]. На основі цього побудовано поділ плазмід грамнегативних бактерій на групи несумісності. Така система була розроблена в першу чергу для відслідковування шляхів розповсюдження плазмід, що несуть гени антибіотикорезистентності, а також появу нових позахромосомних елементів.

Класичним методом визначення типу плазмід є виявлення репліконів методом гібридизації із міченими молекулами ДНК. Проте цей метод є досить складним та довготривалим. Із впровадженням молекулярних методів у діагностику було розроблено метод ПЛР-типування плазмід шляхом ідентифікації репліконів різних типів плазмід [392]. Це значно спрощує виявлення типів плазмід та в подальшому може бути допоміжним методом для виявлення плазмід, що несуть гени антибіотикорезистентності.

У плазмідах сальмонел на сьогодні виявлено генетичні детермінанти резистентності до сульфаніламідів, тетрациклінів, та β -лактамів. Однак, за літературними даними, гени резистентності до тетрациклінів можуть варіюватися, і для сальмонел відомі додаткові гени резистентності до даного класу препаратів.

Відомо також, що гени антибіотикорезистентності здатні накопичуватися на консервативних ділянках інтегронів [393]. Останній може мати як хромосомну, так і плазмідну локалізацію.

У сальмонел виявлено ряд генів, які кодують специфічні фактори і зумовлюють резистентність бактерії до дії макрофагів. В першу чергу – це здатність синтезувати супероксиддисмутази, що забезпечує подальшу адгезію та колонізацію. Ген, що кодує Cu/Zn-залежні супероксиддисмутази *sodCI* відноситься до профагу *Gifsy-2*, який широко розповсюджений серед штамів

S. Typhimurium, а також зустрічається у деяких штамів, що відносяться до сероварів Newport, Dublin, Weltevreden, Choleraesuis, Paratyphi C [394]. Ще один помірний бактеріофаг, що також відноситься до родини *Siphoviridae* – *Gifsy-1* містить ген *gipA*. Білок, який кодується цим геном, виконує функцію колонізації тонкого кишечника. Це дозволяє бактерії розмножуватися тривалий час для накопичення популяції, достатньої для інвазії. Остання відбувається за участі системи секреції білків 3 типу (T3SS1) [395]. Завдяки цьому у клітину доставляється ряд білків, які виконують функцію перебудови цитоскелету еукаріотичних клітин [396]. Один із них – білок *sopE*, який кодується однойменним геном та походить від помірного бактеріофагу *SopEφ*. Останній відноситься до родини *Myoviridae* та має подібну будову до коліфагу P2 [397]. Вперше був виділений методом індукції мітоміцином C зі штаму *S. Typhimurium* DT204 [398].

Наявність такої комбінації генів та повного фагу у сальмонели, що показано у досліді індукції, свідчить про циркуляцію потенційно високопатогенних штамів нетифоїдних сальмонел, що несе загрозу спалахів зоонозів та подальше їх розповсюдження.

Індукція помірних фагів у музейного штаму наглядно демонструє збереження фагів у геномі бактерії. Отже, не дивлячись на те, що фаги локалізуються на позахромосомних елементах, вони здатні зберігатися протягом довгого часу без циркуляції штаму в навколишньому середовищі.

Бактеріофаги – це віруси мікроорганізмів, які існують у двох основних формах: літичні та помірні. Принципова різниця між ними полягає у тому, що помірні фаги здатні, залежно від умов, лізувати бактерію або ж вбудовуватися в її геном і змінювати її фенотипові властивості [399]. Найчастіший результат інфікування бактерій помірними фагами – внесення в геном бактерії генів, що посилюють інвазивні та патогенні властивості. Типовим прикладом цього є інфікування сальмонел профагом *sopEφ*. Як відомо ключовим для інвазії та виживання для сальмонел всередині клітин є бактеріальна система секреції білків 3 типу T3SS1 [400]. Вона фактично є механізмом для транслокації

білкових факторів патогенності із бактеріальної цитоплазми у цито-плазму клітини хазяїна і складається із не менше ніж 20 білків [401]. Ген *sopE*, який входить до *T3SS1* і джерелом якого є профаг *sopEφ* (належить до родини *Myoviridae*), кодує однойменний білок, який взаємодіє з актиновим цитоскелетом, спричиняючи його перебудову. За втрати цього гена сальмонели можуть значною мірою зменшувати свою інвазивність [402].

Серед помірних фагів, у сальмонел часто зустрічаються профаги родини *Siphoviridae* (*Gifsy-1*, *Gifsy-2*). Обидва фаги здатні до індукції за дії УФ-випромінювання та Мітоміцину С [403]. *Gifsy-1* вносить до геному бактерії потенційні гени вірулентності, основним з яких є *gipA*. Експресія цього гена впливає на колонізацію тонкого кишечника сальмонелами, а його делеція призводить до значної втрати вірулентності бактерії [404]. Такий значний вплив на вірулентність пояснюється тим, що за експресії *gipA* бактерії мають здатність персистувати у Пейєрових пляшках [405]. Подібний вплив на вірулентність бактерій має профаг *Gifsy-2*, який є носієм гена *sodC1*. Останній, викликаючи синтез супероксиддисмутази, є фактором патогенності та підвищує вірулентність штамів у п'ять разів [406].

Крім того, між цими двома бактеріофагами встановлена чітка взаємозалежність: за наявності у геномі сальмонели профага *Gifsy 2*, вплив *Gifsy-1* не виявляється. Однак останній здатен підсилювати патогенність бактерій за відсутності профага *Gifsy-2*, але за умови, що ген *sodC1* інтегрований у хромосому [407–412].

З огляду на наведені вище дані, гени помірних фагів здатні впливати на вірулентність сальмонел. Тому дослідження їх поширення серед штамів, що циркулюють у птахогосподарствах є важливим для пошуку шляхів контролю за епізоотологічною ситуацією із сальмонельозу.

Метод полімеразної ланцюгової реакції є дуже перспективним у лабораторній діагностиці бактеріальних інфекцій. Зокрема через швидкість отримання результатів та високу чутливість методу. ПЛР використовується не лише для ідентифікації геному збудника, але, в деяких випадках, і для

підтвердження результатів виділення чистої культури бактеріологічним методом та для диференціації вакцинних і польових штамів [413–416]. Залежно від мети і задач використовують різні модифікації, найчастіше – полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі.

У даному дослідженні проводилося підтвердження роду *Salmonella* та сероварів Enteritidis та Typhimurium у ПЛР-РЧ. Було встановлено, що специфічність даного набору праймерів становить 100 %. Окрім того дані праймери можуть бути використані також і в мультиплексному варіанті, що дозволяє одночасно проводити ідентифікацію роду *Salmonella*, а також сероварів Enteritidis та Typhimurium.

Дані серовари є одними з найбільш поширених. В Україні протягом 2015 – 2018 років їхня частка становила 35,2 % серед усіх сальмонел, виділених з біологічного та патологічного матеріалу тварин і птиці. Варто зазначити, що ці серовари відносять до неадаптованих, оскільки вони є патогенними для різних видів, зокрема у дорослого поголів'я птиці інфекція перебігає безсимптомно та спричиняє трансоваріальне інфікування [351]. За даними EFSA серовар Enteritidis є домінуючим у стадах несучок, і його відсоток зростає з 2016 [49, 76, 92, 105–106, 109]. У 2017 захворюваність серед людей зросла до 91662 випадків, серед яких у 36,8% інфекція була спричинена споживанням курячих яєць [111]. Тому існує необхідність ретельного контролю циркуляції нетифоїдних сероварів у птахівництві для безпеки харчової продукції.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі 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 бактеріофагзалежної 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, тимчасом 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 1×10^4 до 2×10^7 . Серед польових штамів зони лізису встановлено у 38 з 57 (66 %) в титрах від 2×10^3 до 4×10^7 .

У штаму *S. Gallinarum Pullorum* Ставропольський результат індукції був негативним (відсутні зони лізису на газоні добової культури на твердому поживному середовищі), однак попередньо в ПЛР 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. Hadar* (*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 штаммах виду *Salmonella enterica*.
10. Розроблено мультиплексну систему для ідентифікації роду *Salmonella* та сероварів Enteritidis і Typhimurium 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 дисертаційної роботи розроблено методичні рекомендації з індикації та диференціації бактерій роду *Salmonella* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, затверджені і прийняті до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Держпродспоживслужби України (протокол №3 від 4 жовтня 2019 р)

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Windhorst, Hans-Wilhelm. "Dynamics and patterns of global poultry-meat production." *Poultry quality evaluation*. Woodhead Publishing, 2017. 1-25.
2. Mottet, Anne, and Giuseppe Tempio. "Global poultry production: current state and future outlook and challenges." *World's Poultry Science Journal* 73.2 (2017): 245-256.
3. Athrey, Giridhar. "Poultry genetics and breeding." *Animal Agriculture*. Academic Press, 2020. 317-330.
4. Полегенька, Марина Анатоліївна. "Аналіз сучасного стану виробництва продукції птахівництва в Україні." *Економіка та держава* 3 (2019): 137-143.
5. Сегеда, Сергій Андрійович. "Аграрно-продовольче забезпечення населення України." *Економіка АПК* 10 (2017): 40-48.
6. Prevention, detection, and control of *Salmonella* in poultry. Terrestrial Animal Health Code. Paris. Office International des Epizooties (OIE). 2015.
7. Каришева, А. Ф. "Спеціальна епізоотологія: підручник." Київ: Вища освіта, 2002. 703 с.
8. Бессарабов, Борис Филиппович, и Александр Андреевич Сидорчук. *Инфекционные болезни животных*. Москва: КолосС, 2007. 671 с.
9. Antunes, Patrícia, et al. "Salmonellosis: the role of poultry meat." *Clinical Microbiology and Infection* 22.2 (2016): 110-121.
10. Foley, Steven L., et al. "Salmonella pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77.4 (2013): 582-607.
11. Andrés, Sara, et al. "Epidemiology of subclinical salmonellosis in wild birds from an area of high prevalence of pig salmonellosis: phenotypic and genetic profiles of *Salmonella* isolates." *Zoonoses and Public Health* 60.5 (2013): 355-365.
12. Argüello, Hector, et al. "Surveillance data highlights feed form, biosecurity, and disease control as significant factors associated with *Salmonella* infection on farrow-to-finish pig farms." *Frontiers in microbiology* 9 (2018): 187.

13. Наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України 19.09.2016 № 310. Інструкція з профілактики та ліквідації сальмонельозу птиці: Web: [https:// zakon.rada.gov.ua/rada/show/z1344-16](https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/z1344-16).
14. Fowl typhoid and pullorum disease. Chapter 2.3.11. Terrestrial Manual. Paris. Office International des Epizooties (OIE). 2018.
15. Swayne, David E and Glisson, John R. eds. Diseases of poultry. John Wiley & Sons, Inc., 2013.
16. Uzzau, Sergio, et al. "Host adapted serotypes of Salmonella enterica." *Epidemiology & Infection* 125.2 (2000): 229-255.
17. Boyen, Filip, et al. "Non-typhoidal Salmonella infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control." *Veterinary microbiology* 130.1-2 (2008): 1-19.
18. de Freitas, Camila Guimarães, et al. "PCR multiplex for detection of Salmonella Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat." *International journal of food microbiology* 139.1-2 (2010): 15-22.
19. Gomez, Tomas M., et al. "Foodborne salmonellosis." *World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales* 50.1-2 (1997): 81-89.
20. Silva, Claudia, Edmundo Calva, and Stanley Maloy. "One health and food-borne disease: Salmonella transmission between humans, animals, and plants." *One Health: People, Animals, and the Environment* (2014): 137-148.
21. Якубчак, Ольга Миколаївна and Кобиш, А. І. "Salmonella enteritidis—збудник емерджентної харчової токсикоінфекції." *Сучасне птахівництво* 7 (2012): 9-12.
22. Галка, І. В., et al. "Поширення сальмонельозу тварин та птиці в Україні у 2015–2018 роках." *Ветеринарна біотехнологія* 35 (2019): 22-29.
23. Гаркавенко, Тетяна Олександрівна, Яблонська, О. В. "Циркуляція сальмонел в Україні.", *Ветеринарна біотехнологія* (2016): 27–36.

24. Фотіна, Тетяна Іванівна, et al. "Моніторинг сальмонельозної інфекції птиці." *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина* 6 (2016): 141-144.
25. Ушкалов, Валерій Олександрович. "Аналіз результатів лабораторних досліджень на бактеріози у Харківській області." *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького* 19.78 (2017).
26. Фотіна, Тетяна Іванівна et al. "Роль моніторингу та контролю за токсикоінфекціями та токсикозами у забезпеченні біобезпеки населення України." *Ветеринарна біотехнологія* 32 (2) (2018): 585-592.
27. Wigley, P., et al. "Salmonella enterica serovar Pullorum persists in splenic macrophages and in the reproductive tract during persistent, disease-free carriage in chickens." *Infection and immunity* 69.12 (2001): 7873-7879.
28. Volkova, Victoriya V., R. Hartford Bailey, and Robert W. Wills. "Salmonella in broiler litter and properties of soil at farm location." *PloS one* 4.7 (2009): e6403.
29. Yan, S. Steve, et al. "An overview of Salmonella typing: public health perspectives." *Clinical and Applied Immunology Reviews* 4.3 (2004): 189-204.
30. Alikhan, Nabil-Fareed, et al. "A genomic overview of the population structure of Salmonella." *PLoS genetics* 14.4 (2018): e1007261.
31. Eng, Shu-Kee, et al. "Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance." *Frontiers in Life Science* 8.3 (2015): 284-293.
32. Song, Qifa, et al. "Overview of the development of quinolone resistance in Salmonella species in China, 2005–2016." *Infection and drug resistance* 11 (2018): 267.
33. Besser, John M. "Salmonella epidemiology: A whirlwind of change." *Food microbiology* 71 (2018): 55-59.
34. Andrews, Jason R., and Edward T. Ryan. "Diagnostics for invasive Salmonella infections: current challenges and future directions." *Vaccine* 33 (2015): C8-C15.

35. Kuijpers, Laura MF, et al. "Diagnostic accuracy of antigen-based immunochromatographic rapid diagnostic tests for the detection of Salmonella in blood culture broth." *PLoS One* 13.3 (2018): e0194024.
36. Klein, Dieter. "Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations." *Trends in molecular medicine* 8.6 (2002): 257-260.
37. Олійник, Людмила Вікторівна. Система моніторингу, контролю і профілактики токсикоінфекцій сальмонельозної та ешерихіозної етіології. автореф. Дисертації д-ра вет. наук: 16.00.09 ; Львівська національна академія ветеринарної медицини ім. С.З.Гжицького. - Львів, 2004. - 33 с.:
38. Galan, J. E. "Molecular and cellular bases of Salmonella entry into host cells." *Bacterial Invasiveness* (1996): 43-60.
39. Vazelle, Emilie, et al. "GipA factor supports colonization of Peyer's Patches by Crohn's disease-associated Escherichia coli." *Inflammatory bowel diseases* 22.1 (2016): 68-81.
40. Jennings, Elliott, Teresa LM Thurston, and David W. Holden. "Salmonella SPI-2 type III secretion system effectors: molecular mechanisms and physiological consequences." *Cell host & microbe* 22.2 (2017): 217-231.
41. Ареф'єв, Василь Л., et al. "Порівняння фенотипічних та генотипічних профілів антибіотикорезистентності ізолятів сальмонел, стійких до бета-лактамних антибіотиків." *Ветеринарна медицина* (2018).
42. Dallap Schaer, B. L., H. Aceto, and S. C. Rankin. "Outbreak of salmonellosis caused by Salmonella enterica serovar Newport MDR-AmpC in a large animal veterinary teaching hospital." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24.5 (2010): 1138-1146.
43. Muhammad, Maryam, et al. "Prevalence of Salmonella associated with chick mortality at hatching and their susceptibility to antimicrobial agents." *Veterinary microbiology* 140.1-2 (2010): 131-135.
44. Wibisono, Freshindy Marissa, et al. "A review of salmonellosis on poultry farms: public health importance." *Systematic Reviews in Pharmacy* 11.9 (2020): 481-486.

45. Grimont, P. A., & Weill, F. X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, 9, 1-166.
46. Fookes, Maria, et al. "Salmonella bongori provides insights into the evolution of the Salmonellae." *PLoS Pathog* 7.8 (2011): e1002191.
47. Foti, Maria, et al. "Salmonella bongori 48: z35:—in Migratory Birds, Italy." *Emerging infectious diseases* 15.3 (2009): 502.
48. Mahbub, K. R., M. M. Rahman, and M. M. Ahmed. "Characterization of antibiotic resistant *Salmonella* spp isolated from chicken eggs of Dhaka city." *Journal of Scientific Research* (2011).
49. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017 EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. EFSA Journal. 2018. Vol. 16(12):5500. 262 p.
50. Feng, Ye, et al. "Genomic comparison between *Salmonella Gallinarum* and *Pullorum*: differential pseudogene formation under common host restriction." *PLoS One* 8.3 (2013): e59427.
51. Hafez, Hafez M., and Silvia Jodas. "Salmonella infections in turkeys." *Salmonella in domestic animals* 1 (2000): 133-156.
52. Cogan, T. A., and T. J. Humphrey. "The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK." *Journal of applied microbiology* 94 (2003): 114-119.
53. Fernandes, Sueli A., et al. "Salmonella serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48.4 (2006): 179-184.
54. Hall, M. L. M., and B. Rowe. "Salmonella arizonae in the United Kingdom from 1966 to 1990." *Epidemiology & Infection* 108.1 (1992): 59-65.
55. Geue, L., and U. Löschner. "Salmonella enterica in reptiles of German and Austrian origin." *Veterinary microbiology* 84.1-2 (2002): 79-91.
56. Rabsch, Wolfgang, et al. "Competitive exclusion of *Salmonella* enteritidis by *Salmonella gallinarum* in poultry." *Emerging infectious diseases* 6.5 (2000): 443.

57. Gantois, Inne, et al. "Salmonella enterica serovar Enteritidis genes induced during oviduct colonization and egg contamination in laying hens." *Applied and environmental microbiology* 74.21 (2008): 6616-6622.
58. De Buck, J., et al. "Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by Salmonella." *Journal of Applied Microbiology* 97.2 (2004): 233-245.
59. Varmuzova, Karolina, et al. "Composition of gut microbiota influences resistance of newly hatched chickens to Salmonella Enteritidis infection." *Frontiers in microbiology* 7 (2016): 957.
60. P. A. Barrow, O.C. Freitas Neto. "Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review." *Avian pathology* 40.1 (2011): 1-13.
61. H. L. Shivaprasad, P. A. Barrow. "Pullorum disease and fowl typhoid." *Diseases of poultry, 12th ed. YM Saif, AM Fadley, JR Glisson, LR McDougald, LK Nolan, and DE Swayne, eds. Blackwell Publishing, Ames, IA* (2008): 620-634.
62. Tondo, E. C., and A. C. Ritter. "Salmonella and Salmonellosis in Southern Brazil: a review of the last decade." *Nova Science Publishers, Inc. New York* (2012): 175-191.
63. Revolledo, L. "Vaccines and vaccination against fowl typhoid and pullorum disease: An overview and approaches in developing countries." *Journal of Applied Poultry Research* 27.3 (2018): 279-291.
64. Xian, Honghong, et al. "The SPI-19 encoded T6SS is required for Salmonella Pullorum survival within avian macrophages and initial colonization in chicken dependent on inhibition of host immune response." *Veterinary Microbiology* 250 (2020): 108867.
65. Guo, Xiaodong, et al. "Quinolone resistance phenotype and genetic characterization of Salmonella enterica serovar Pullorum isolates in China, during 2011 to 2016." *BMC microbiology* 18.1 (2018): 1-7.
66. OIE report on pullorum disease. Office International des Epizooties (OIE), Paris. web

https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=30655

67. Герілович, А. П., К. В. Глєбова, В. Л. Ареф'єв. "Розробка та апробація системи моніторингу для виявлення контамінації біологічних об'єктів сальмонелами." *Ветеринарна медицина* 99 (2014): 27-30.
68. Kogut, Michael H., et al. "Chicken-specific kinome array reveals that *Salmonella enterica* serovar Enteritidis modulates host immune signaling pathways in the cecum to establish a persistence infection." *International journal of molecular sciences* 17.8 (2016): 1207.
69. Dieye, Yakhya, et al. "The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *BMC microbiology* 9.1 (2009): 1-14.
70. Morgan, Eirwen, et al. "Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Molecular microbiology* 54.4 (2004): 994-1010.
71. Monack, Denise M. "Salmonella persistence and transmission strategies." *Current opinion in microbiology* 15.1 (2012): 100-107.
72. Roll, V. F. B., M. A. Dai Prá, and A. P. Roll. "Research on *Salmonella* in broiler litter reused for up to 14 consecutive flocks." *Poultry science* 90.10 (2011): 2257-2262.
73. Umali, Dennis V., et al. "Transmission and shedding patterns of *Salmonella* in naturally infected captive wild roof rats (*Rattus rattus*) from a *Salmonella*-contaminated layer farm." *Avian diseases* 56.2 (2012): 288-294.
74. Osowski, Germana Vizzotto, et al. "Comparative study of egg contamination with *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium." *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 56.1 (2019): e150479-e150479.
75. Rehkopf, A. C., et al. "Advanced Oxidation Process sanitization of hatching eggs reduces *Salmonella* in broiler chicks." *Poultry science* 96.10 (2017): 3709-3716.

76. EFSA Panel on Biological Hazards (EFSA BIOHAZ Panel), et al. "Salmonella control in poultry flocks and its public health impact." *EFSA Journal* 17.2 (2019): e05596.
77. Liljebjelke, Karen A., et al. "Vertical and horizontal transmission of Salmonella within integrated broiler production system." *Foodborne Pathogens & Disease* 2.1 (2005): 90-102.
78. Gantois, Inne, et al. "Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis." *FEMS microbiology reviews* 33.4 (2009): 718-738.
79. De Buck, J., et al. "Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by Salmonella." *Journal of Applied Microbiology* 97.2 (2004): 233-245.
80. De Reu, K., et al. "Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including Salmonella enteritidis." *International journal of food microbiology* 112.3 (2006): 253-260.
81. Zhu, Jianghui, et al. "Prevalence and quantification of Salmonella contamination in raw chicken carcasses at the retail in China." *Food Control* 44 (2014): 198-202.
82. Heyndrickx, Marc, et al. "Routes for Salmonella contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse." *Epidemiology & Infection* 129.2 (2002): 253-265.
83. Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the control of salmonella and other specified food-borne zoonotic agents. Web <http://data.europa.eu/eli/reg/2003/2160/oj>
84. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC. Web <http://data.europa.eu/eli/dir/2003/99/oj>
85. Dangel, Alexandra, et al. "Genetic diversity and delineation of Salmonella Agona outbreak strains by next generation sequencing, Bavaria, Germany, 1993 to 2018." *Eurosurveillance* 24.18 (2019): 1800303.

86. European Food Safety Authority, and European Centre for Disease Prevention and Control. *Multi-country outbreak of Salmonella Agona infections possibly linked to ready-to-eat food*. Vol. 15. No. 7. 2018.
87. Cerni, Tomas. "Multinational outbreak of salmonellosis (Salmonella Bareilly) confirmed by whole genome sequencing in the Czech Republic". 24th EURL - Salmonella workshop, 28. – 29. of May 2019, Amersfoort, The Netherlands. Web. <https://www.eurlsalmonella.eu/en/documenten/2019-tomas-cerny-multi-country-outbreak-of-salmonella-bareilly-confirmed-with-wgs-in>
88. Kudaka, Jun, et al. "Characterization of Salmonella isolated in Okinawa, Japan." *Japanese journal of infectious diseases* 59.1 (2006): 15.
89. Torpdahl, M., et al. "A Danish Salmonella Bareilly outbreak investigated by the use of whole genome sequencing." *10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers*. 2013.
90. Hoffmann, Maria, et al. "Tracing origins of the Salmonella Bareilly strain causing a food-borne outbreak in the United States." *The Journal of Infectious Diseases* 213.4 (2016): 502-508.
91. Brown, Eric, et al. "Use of whole-genome sequencing for food safety and public health in the United States." *Foodborne pathogens and disease* 16.7 (2019): 441-450.
92. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal 2018;16(12):5500, 262 pp. Web. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
93. Hoszowski, Andrzej, et al. "Fifteen years of successful spread of Salmonella enterica serovar Mbandaka clone ST413 in Poland and its public health consequences." *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 23.2 (2016).
94. Le Bouquin, S., et al. "Prevalence and risk factors for Salmonella spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period." *Preventive veterinary medicine* 97.3-4 (2010): 245-251.

95. Dhanani, Akhilesh S., et al. "Genomic comparison of non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar and Kentucky isolates from broiler chickens." *PLoS One* 10.6 (2015): e0128773.
96. Elgroud, R., et al. "Characteristics of *Salmonella* contamination of broilers and slaughterhouses in the region of Constantine (Algeria)." *Zoonoses and public health* 56.2 (2009): 84-93.
97. Nógrády, N., et al. "Multidrug resistant clones of *Salmonella* Infantis of broiler origin in Europe." *International journal of food microbiology* 157.1 (2012): 108-112.
98. Tarabees, Reda, et al. "Isolation and characterization of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from chicken meat in Egypt." *The Journal of Infection in Developing Countries* 11.04 (2017): 314-319.
99. European Food Safety Authority (EFSA). "The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004." *EFSA Journal* 3.12 (2005): 310ar.
100. European Food Safety Authority (EFSA). "The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005." *EFSA Journal* 4.12 (2006): 94r.
101. European Food Safety Authority (EFSA). "The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006." *EFSA Journal* 5.12 (2007): 130r.
102. European Food Safety Authority (EFSA). "The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007." *EFSA Journal* 7.1 (2009): 223r.
103. Lahuerta, Angela, Birgitte Helwigh, and P. Makela. "Zoonoses in Europe: distribution and trends-the EFSA-ECDC Community Summary Report 2008." *Euro Surveill* 15.1 (2010).

104. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008, *EFSA Journal*;2010 8(1):1496.
105. European Food Safety Authority, and European Centre for Disease Prevention and Control. "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010." *EFSA Journal* 10.3 (2012): 2597.
106. European Food Safety Authority, and European Centre for Disease Prevention and Control. "The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015." *EFSA Journal* 15.2 (2017): e04694.
107. Lahuerta, A., et al. "Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics-the EFSA-ECDC summary report 2009." *Eurosurveillance* 16.13 (2011): 19832.
108. European Food Safety Authority, and European Centre for Disease Prevention and Control. "The European Union Summary REPORT on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012." *EFSA Journal* 12.2 (2014): 3547.
109. European Food Safety Authority, and European Centre for Disease Prevention and Control. "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016." *EFSA Journal* 15.12 (2017): e05077.
110. European Food Safety Authority, and European Centre for Disease Prevention and Control. "EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013." *EFSA Journal* 13.2 (2015): 4036.
111. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017." *EFSA Journal* 16.12 (2018): e05500.

112. Tindall, B. J., et al. "Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55.1 (2005): 521-524.
113. Herrera-León, Silvia, et al. "Molecular characterization of a new serovar of *Salmonella bongori* 13, 22: z39:–isolated from a lizard." *Research in microbiology* 156.4 (2005): 597-602.
114. Giammanco, Giovanni M., et al. "Persistent endemicity of *Salmonella bongori* 48: z35:– in southern Italy: molecular characterization of human, animal, and environmental isolates." *Journal of clinical microbiology* 40.9 (2002): 3502-3505.
115. Nastasi, A., et al. "Multiple typing of strains of *Salmonella enterica* subsp. *bongori* ser. 48: Z35:-isolated in southern Italy." *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*. Vol. 139. No. 5. Elsevier Masson, 1988.
116. Vlahović, Ksenija, et al. "Campylobacter, *Salmonella* and Chlamydia in free-living birds of Croatia." *European Journal of Wildlife Research* 50.3 (2004): 127-132.
117. Arslan, Seza, and Ayla Eyi. "Occurrence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* species in retail meat products." *Journal of food protection* 73.9 (2010): 1613-1617.
118. Fasure, A. K., A. M. Deji-Agboola, and K. O. Akinyemi. "Antimicrobial resistance patterns and emerging fluoroquinolone resistant *Salmonella* isolates from poultry and asymptomatic poultry workers." *African Journal of Microbiology Research* 6.11 (2012): 2610-2615.
119. Cummings, K. J., et al. "Temporal clusters of bovine *Salmonella* cases at a veterinary medical teaching hospital, 1996–2007. Vector-borne and Zoonotic Diseases (Epub ahead of print)." *Kevin James Cummings May 2010* (2010): 89.
120. Gruzdev, Nadia, Riky Pinto, and Shlomo Sela. "Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage." *Food microbiology* 32.2 (2012): 415-422.

121. Appalaraju, B., S. Parvathi, and M. Vijayalakshmi. "Fatal fulminant Salmonella infantis meningitis with septicemia." *J Commun Dis* 43.4 (2011): 285-120.
122. Garrity, George, Brenner, Don J., Krieg, Noel R., Staley, James R. (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria* Springer Science & Business Media, 2005.
123. Paiva, J. B., et al. "Molecular differentiation of Salmonella Gallinarum and Salmonella Pullorum by RFLP of fliC gene from Brazilian isolates." *Brazilian Journal of Poultry Science* 11.4 (2009): 271-275.
124. Doorduyn, Y., et al. "Risk factors for Salmonella Enteritidis and Typhimurium (DT104 and non-DT104) infections in The Netherlands: predominant roles for raw eggs in Enteritidis and sandboxes in Typhimurium infections." *Epidemiology & Infection* 134.3 (2006): 617-626.
125. Pan, Hang, et al. "Multiple food-animal-borne route in transmission of antibiotic-resistant Salmonella Newport to humans." *Frontiers in microbiology* 9 (2018): 23.
126. Christidis, Tanya, et al. "A comparative exposure assessment of foodborne, animal contact and waterborne transmission routes of Salmonella in Canada." *Food Control* 109 (2020): 106899.
127. Eng, Shu-Kee, et al. "Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance." *Frontiers in Life Science* 8.3 (2015): 284-293.
128. Garner, Cherilyn D., et al. "Perturbation of the small intestine microbial ecology by streptomycin alters pathology in a Salmonella enterica serovar typhimurium murine model of infection." *Infection and immunity* 77.7 (2009): 2691-2702.
129. Rodenburg, Wendy, et al. "Gene expression response of the rat small intestine following oral Salmonella infection." *Physiological genomics* 30.2 (2007): 123-133.
130. van Asten, Alphons JAM, and Jaap E. van Dijk. "Distribution of "classic" virulence factors among Salmonella spp." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 44.3 (2005): 251-259.

131. Ibarra, J. Antonio, and Olivia Steele-Mortimer. "Salmonella—the ultimate insider. Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival." *Cellular microbiology* 11.11 (2009): 1579-1586.
132. Marcus, Sandra L., et al. "Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages." *Microbes and infection* 2.2 (2000): 145-156.
133. Gerlach, Roman G., and Michael Hensel. "Salmonella pathogenicity islands in host specificity, host pathogen-interactions and antibiotics resistance of Salmonella enterica." *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* 120.7/8 (2007): 317.
134. Yue, Min, et al. "Diversification of the Salmonella fimbriae: a model of macro-and microevolution." *PloS one* 7.6 (2012): e38596.
135. Thorns, C.J. "Salmonella fimbriae: novel antigens in the detection and control of Salmonella infections." *British Veterinary Journal* 151.6 (1995): 643-658.
136. McQuiston, J. R., et al. "Sequencing and comparative analysis of flagellin genes fliC, fljB, and flpA from Salmonella." *Journal of clinical microbiology* 42.5 (2004): 1923-1932.
137. Awad, W. A., et al. "Intestinal epithelial responses to Salmonella enterica serovar Enteritidis: effects on intestinal permeability and ion transport." *Poultry science* 91.11 (2012): 2949-2957.
138. Khan, Shahid A., et al. "A lethal role for lipid A in Salmonella infections." *Molecular microbiology* 29.2 (1998): 571-579.
139. Gibbons, Henry S., et al. "Role of Mg²⁺ and pH in the modification of Salmonella lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells." *Molecular microbiology* 55.2 (2005): 425-440.
140. Ludwig, Albrecht, et al. "SlyA, a regulatory protein from Salmonella typhimurium, induces a haemolytic and pore-forming protein in Escherichia coli." *Molecular and General Genetics MGG* 249.5 (1995): 474-486.
141. Barrow, P. A., and M. A. Lovell. "Invasion of Vero cells by Salmonella species." *Journal of medical microbiology* 28.1 (1989): 59-67.

142. Kita, Eiji, et al. "Isolation of a cytotoxin from L-form *Salmonella typhimurium*." *FEMS microbiology letters* 109.2-3 (1993): 179-184.
143. Ashkenazi, S., et al. "Quantitative analysis and partial characterization of cytotoxin production by *Salmonella* strains." *Infection and immunity* 56.12 (1988): 3089-3094.
144. Ketyi, I., et al. "Shigella dysenteriae 1-like cytotoxic enterotoxins produced by *Salmonella* strains." *Acta microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 26.3 (1979): 217-223.
145. Reitmeyer, James C., Johnny W. Peterson, and Katharine J. Wilson. "Salmonella cytotoxin: a component of the bacterial outer membrane." *Microbial pathogenesis* 1.5 (1986): 503-510.
146. Prager, Rita, Angelika Fruth, and H. Tschäpe. "Salmonella enterotoxin (stn) gene is prevalent among strains of *Salmonella enterica*, but not among *Salmonella bongori* and other Enterobacteriaceae." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 12.1 (1995): 47-50.
147. Groisman, Eduardo A., and Howard Ochman. "Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps." *Cell* 87.5 (1996): 791-794.
148. Chatterjee, Ritika, et al. "Enteropathogens: Tuning their gene expression for Hassle-Free survival." *Frontiers in microbiology* 9 (2019): 3303.
149. Rychlik, Ivan, et al. "Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens." *BMC microbiology* 9.1 (2009): 1-9.
150. Wang, Ying, et al. "Identification of an Integrase That Responsible for Precise Integration and Excision of *Riemerella anatipestifer* Genomic Island." *Frontiers in microbiology* 10 (2019): 2099.
151. Burrus, Vincent, and Matthew K. Waldor. "Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements." *Research in microbiology* 155.5 (2004): 376-386.

152. Pickard, Derek, et al. "Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7." *Journal of bacteriology* 185.17 (2003): 5055-5065.
153. Hensel, Michael. "Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*." *International Journal of Medical Microbiology* 294.2-3 (2004): 95-102.
154. Wang, Shaohui, et al. "The ferric uptake regulator represses type VI secretion system function by binding directly to the *clpV* promoter in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Infection and immunity* 87.10 (2019).
155. Velásquez, Juan C., et al. "SPI-9 of *Salmonella enterica* serovar Typhi is constituted by an operon positively regulated by RpoS and contributes to adherence to epithelial cells in culture." *Microbiology* 162.8 (2016): 1367-1378.
156. Que, Fengxia, Shuyan Wu, and Rui Huang. "Salmonella pathogenicity island 1 (SPI-1) at work." *Current microbiology* 66.6 (2013): 582-587.
157. Hapfelmeier, Siegfried, et al. "The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms." *The Journal of Immunology* 174.3 (2005): 1675-1685.
158. Rychlik, Ivan, et al. "Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens." *BMC microbiology* 9.1 (2009): 1-9.
159. Eichelberg, Katrin, and Jorge E. Galán. "Differential regulation of *Salmonella* typhimurium type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators *InvF* and *HilA*." *Infection and immunity* 67.8 (1999): 4099-4105.
160. Wee, Daniel H., and Kelly T. Hughes. "Molecular ruler determines needle length for the *Salmonella* Spi-1 injectisome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.13 (2015): 4098-4103.
161. Martínez-Flores, Irma, et al. "In silico clustering of *Salmonella* global gene expression data reveals novel genes co-regulated with the SPI-1 virulence genes through *HilD*." *Scientific reports* 6.1 (2016): 1-12.

162. Hamed, Selwan, et al. "Synergistic action of SPI-1 gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium through transcriptional crosstalk with the flagellar system." *BMC microbiology* 19.1 (2019): 1-12.
163. Chan, Kaman, et al. "Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar Typhimurium DNA microarray." *Journal of Bacteriology* 185.2 (2003): 553-563.
164. Chiu, Cheng-Hsun, et al. "The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen." *Nucleic acids research* 33.5 (2005): 1690-1698.
165. Cao, Guojie, et al. "Phylogenetics and differentiation of *Salmonella* Newport lineages by whole genome sequencing." *PloS one* 8.2 (2013): e55687.
166. Сиволоб, Андрій В. "Генетика: підручник." К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет" (2008).
167. Сиволоб, Андрій В. "Молекулярна біологія." Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет» (2008).
168. Lodish, Harvey, and S. Lawrence Zipursky. "Molecular cell biology." *Biochem Mol Biol Educ* 29 (2001): 126-133.
169. Snyder, Larry, and Wendy Champness. *Molecular genetics of bacteria*. Vol. 19. Washington, DC: Asm Press, 1997.
170. Kipper, Diéssy, et al. "Salmonella serotype assignment by sequencing analysis of intergenic regions of ribosomal RNA operons." *Poultry science* 98.11 (2019): 5989-5998.
171. Gunn, John S., William J. Belden, and Samuel I. Miller. "Identification of PhoP-PhoQ activated genes within a duplicated region of the *Salmonella typhimurium* chromosome." *Microbial pathogenesis* 25.2 (1998): 77-90.
172. Bergeron, Julien RC, et al. "A refined model of the prototypical *Salmonella* SPI-1 T3SS basal body reveals the molecular basis for its assembly." *PLoS Pathog* 9.4 (2013): e1003307.

173. Pareek, Chandra Shekhar, Rafal Smoczynski, and Andrzej Tretyn. "Sequencing technologies and genome sequencing." *Journal of applied genetics* 52.4 (2011): 413-435.
174. Hapfelmeier, Siegfried, et al. "Role of the Salmonella pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in Salmonella enterica subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice." *Infection and immunity* 72.2 (2004): 795-809.
175. Finn, Ciaran E., et al. "A second wave of Salmonella T3SS1 activity prolongs the lifespan of infected epithelial cells." *PLoS pathogens* 13.4 (2017): e1006354.
176. Srikanth, C. V., et al. "Salmonella effector proteins and host-cell responses." *Cellular and Molecular Life Sciences* 68.22 (2011): 3687.
177. Kenney, Linda J. "The role of acid stress in Salmonella pathogenesis." *Current opinion in microbiology* 47 (2019): 45-51.
178. Chakraborty, Smarajit, Hideaki Mizusaki, and Linda J. Kenney. "A FRET-based DNA biosensor tracks OmpR-dependent acidification of Salmonella during macrophage infection." *PLoS biology* 13.4 (2015): e1002116.
179. Richardson, Lauren A. "How salmonella survives the macrophage's acid attack." *PLoS biology* 13.4 (2015): e1002117.
180. Rathman, Michelle, Michael D. Sjaastad, and Stanley Falkow. "Acidification of phagosomes containing Salmonella typhimurium in murine macrophages." *Infection and immunity* 64.7 (1996): 2765-2773.
181. Densen, P., R. A. Clark, and W. M. Nauseef. 1990. Granulocytic phagocytes, p. 78–101. In: G. L. Mandell, R. G. Douglas, and J. E. Bennett (ed.), Principles and practice of infectious diseases, 3rd ed., vol. 1. Churchill Livingstone, New York
182. Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science* 201. 1978. 875–880.
183. Coffey, J. W., and C. D. Duve. 1968. Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* 243: 3255–3263.
184. Steele-Mortimer, Olivia. "The Salmonella-containing vacuole—moving with the times." *Current opinion in microbiology* 11.1 (2008): 38-45.

185. Ахметова, Д. Г., et al. "Сальмонеллы: молекулярные механизмы приспособленности и факторы вирулентности." *Eurasian Journal of Applied Biotechnology* 1 (2012): 3-24.
186. Worley, Micah J., Katherine HL Ching, and Fred Heffron. "Salmonella SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes." *Molecular microbiology* 36.3 (2000): 749-761.
187. Tu, Xuanlin, et al. "The PhoP/PhoQ two-component system stabilizes the alternative sigma factor RpoS in Salmonella enterica." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.36 (2006): 13503-13508.
188. Zhang, Ying, et al. "Reciprocal Regulation of OmpR and Hfq and Their Regulatory Actions on the Vi Polysaccharide Capsular Antigen in Salmonella enterica Serovar Typhi." *Current microbiology* 75.6 (2018): 773-778.
189. Bang, Iel Soo, et al. "OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of Salmonella enterica serovar Typhimurium." *Journal of bacteriology* 182.8 (2000): 2245-2252.
190. Bang, Iel Soo, et al. "Autoinduction of the ompR response regulator by acid shock and control of the Salmonella enterica acid tolerance response." *Molecular microbiology* 44.5 (2002): 1235-1250.
191. Wang, Loo Chien, et al. "The inner membrane histidine kinase EnvZ senses osmolality via helix-coil transitions in the cytoplasm." *The EMBO journal* 31.11 (2012): 2648-2659.
192. Shi, Yixin, et al. "Transcriptional control of the antimicrobial peptide resistance ugtL gene by the Salmonella PhoP and SlyA regulatory proteins." *Journal of Biological Chemistry* 279.37 (2004): 38618-38625.
193. Kato, Akinori, and Eduardo A. Groisman. "The PhoQ/PhoP regulatory network of Salmonella enterica." *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*. Springer, New York, NY, 2008. 7-21.
194. Bijlsma, Jetta JE, and Eduardo A. Groisman. "The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of Salmonella enterica." *Molecular microbiology* 57.1 (2005): 85-96.

195. Cirillo, Daniela Maria, et al. "Macrophage-dependent induction of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival." *Molecular microbiology* 30.1 (1998): 175-188.
196. Ratner, Dmitry, M. Pontus A. Orning, and Egil Lien. "Bacterial secretion systems and regulation of inflammasome activation." *Journal of leukocyte biology* 101.1 (2017): 165-181.
197. Robbe-Saule, Véronique, et al. "Physiological effects of Crl in Salmonella are modulated by σ S level and promoter specificity." *Journal of bacteriology* 189.8 (2007): 2976-2987.
198. Park, Myungseo, et al. "ATP reduction by MgtC and Mg²⁺ homeostasis by MgtA and MgtB enables Salmonella to accumulate RpoS upon low cytoplasmic Mg²⁺ stress." *Molecular microbiology* 110.2 (2018): 283-295.
199. Snavelly, M. D., et al. "Magnesium transport in Salmonella typhimurium. Regulation of mgtA and mgtB expression." *Journal of Biological Chemistry* 266.2 (1991): 824-829.
200. Choi, Eunna, et al. "Elongation factor P controls translation of the mgtA gene encoding a Mg²⁺ transporter during Salmonella infection." *MicrobiologyOpen* (2018): e00680.
201. Kowatz, Thomas, and Michael E. Maguire. "Loss of cytosolic Mg²⁺ binding sites in the Thermotoga maritima CorA Mg²⁺ channel is not sufficient for channel opening." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1863.1 (2019): 25-30.
202. Hmiel, S. P., et al. "Magnesium transport in Salmonella typhimurium: characterization of magnesium influx and cloning of a transport gene." *Journal of bacteriology* 168.3 (1986): 1444-1450.
203. Gall, Aaron R., et al. "High-level, constitutive expression of the mgtC gene confers increased thermotolerance on Salmonella enterica serovar Typhimurium." *Molecular microbiology* (2018).

204. Papp-Wallace, Krisztina M., and Michael E. Maguire. "Regulation of CorA Mg²⁺ channel function affects the virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium." *Journal of bacteriology* 190.19 (2008): 6509-6516.
205. Bearson, Bradley L., Lee Wilson, and John W. Foster. "A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress." *Journal of bacteriology* 180.9 (1998): 2409-2417.
206. Hengge-Aronis, Regine. "Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ S (RpoS) subunit of RNA polymerase." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66.3 (2002): 373-395.
207. Moreno, Matthew, et al. "Regulation of sigma S degradation in *Salmonella enterica* var typhimurium: in vivo interactions between sigma S, the response regulator MviA (RssB) and ClpX." *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2.2 (2000): 245-254.
208. Cabeza, María L., et al. "Induction of RpoS degradation by the two-component system regulator RstA in *Salmonella enterica*." *Journal of bacteriology* 189.20 (2007): 7335-7342.
209. Tang, Tian, et al. "ClpXP affects the cell metabolism of *Salmonella typhimurium* partially in an RpoS-dependent manner." *Metabolomics* 13.12 (2017): 157.
210. Lensmire, Joshua M., et al. "Phosphate and carbohydrate facilitate the formation of filamentous *Salmonella enterica* during osmotic stress." *Microbiology* 164.12 (2018): 1503-1513.
211. Girard, Mary E., et al. "DksA and ppGpp regulate the σ S stress response by activating promoters for the small RNA DsrA and the anti-adaptor protein IraP." *Journal of bacteriology* 200.2 (2018): e00463-17.
212. Рубленко, Наталія Михайлівна. "Молекулярно-генетичні механізми виживання і резистентності сальмонел." *Науковий вісник ветеринарної медицини* 2 (2018): 6-12.
213. Gall, Aaron R., et al. "Mg²⁺ regulates transcription of *mgtA* in *Salmonella Typhimurium* via translation of proline codons during synthesis of the MgtL

- peptide." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.52 (2016): 15096-15101.
214. Papp-Wallace, Krisztina M., et al. "The CorA Mg²⁺ channel is required for the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Journal of bacteriology* 190.19 (2008): 6517-6523.
215. Smith, Ronald L., et al. "The CorA Mg²⁺ transport protein of *Salmonella typhimurium*: mutagenesis of conserved residues in the third membrane domain identifies a Mg²⁺ pore." *Journal of Biological Chemistry* 273.44 (1998): 28663-28669.
216. Froschauer, Elisabeth M., et al. "Fluorescence measurements of free [Mg²⁺] by use of mag-fura 2 in *Salmonella enterica*." *FEMS microbiology letters* 237.1 (2004): 49-55.
217. Tierrez, Alberto, and Francisco García-del Portillo. "The *Salmonella* membrane protein IgaA modulates the activity of the RcsC-YojN-RcsB and PhoP-PhoQ regulons." *Journal of bacteriology* 186.22 (2004): 7481-7489.
218. Soncini, Fernando C., et al. "Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes." *Journal of bacteriology* 178.17 (1996): 5092-5099.
219. Zhou, YanNing, et al. "The RssB response regulator directly targets ζ S for degradation by ClpXP." *Genes & Development* 15.5 (2001): 627-637.
220. Dorich, Victoria, et al. "Structural basis for inhibition of a response regulator of σ S stability by a ClpXP antiadaptor." *Genes & development* 33.11-12 (2019): 718-732.
221. Bearson, S. M., et al. "Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene mviA of *Salmonella typhimurium*." *Journal of Bacteriology* 178.9 (1996): 2572-2579.
222. Bougdour, Alexandre, and Susan Gottesman. "ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.31 (2007): 12896-12901.

223. Bäumler, Andreas J., et al. "Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes." *Journal of bacteriology* 179.2 (1997): 317-322.
224. Fluit, Ad C. "Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*?." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 43.1 (2005): 1-11.
225. Villa, Laura, and Alessandra Carattoli. "Integrans and transposons on the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence plasmid." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49.3 (2005): 1194-1197.
226. Pezzella, Cristina, et al. "Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48.3 (2004): 903-908.
227. Rodríguez, Irene, et al. "Class 1 and class 2 integrans in non-prevalent serovars of *Salmonella enterica*: structure and association with transposons and plasmids." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58.6 (2006): 1124-1132.
228. Escudero, José Antonio, et al. "The integron: adaptation on demand." *Microbiol Spectr* 3.2 (2015).
229. Roth, Adam, and Ronald R. Breaker. "Integron attI1 sites, not riboswitches, associate with antibiotic resistance genes." *Cell* 153.7 (2013): 1417-1418.
230. Hall, Ruth M., and Christina M. Collis. "Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrans." *Drug resistance UPDATES* 1.2 (1998): 109-119.
231. Mazel, Didier, et al. "A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome." *Science* 280.5363 (1998): 605-608.
232. Ward, J. M., and J. Grinsted. "Physical and genetic analysis of the Inc-W group plasmids R388, Sa, and R7K." *Plasmid* 7.3 (1982): 239-250.
233. Carattoli, Alessandra, et al. "Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer β -lactams." *Emerging infectious diseases* 12.7 (2006): 1145.
234. Mazel, Didier. "Integrans: agents of bacterial evolution." *Nature Reviews Microbiology* 4.8 (2006): 608-620.

235. Bissonnette, L., et al. "Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (cmlA) gene of the In4 integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins." *Journal of bacteriology* 173.14 (1991): 4493-4502.
236. Fluit, AC, and F. J. Schmitz. "Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18.11 (1999): 761-770.
237. Recchia, Gavin D., and Ruth M. Hall. "Gene cassettes: a new class of mobile element." *Microbiology* 141.12 (1995): 3015-3027.
238. Stokes, H. W., and Ruth M. Hall. "Sequence analysis of the inducible chloramphenicol resistance determinant in the Tn1696 integron suggests regulation by translational attenuation." *Plasmid* 26.1 (1991): 10-19.
239. Sáenz, Yolanda, et al. "Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48.10 (2004): 3996-4001.
240. Bohn, Chantal, and Philippe Bouloc. "The *Escherichia coli* cmlA gene encodes the multidrug efflux pump Cmr/MdfA and is responsible for isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside exclusion and spectinomycin sensitivity." *Journal of bacteriology* 180.22 (1998): 6072-6075.
241. Yang, Soo Jin, et al. "Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization." *Veterinary microbiology* 86.4 (2002): 295-301.
242. McMillan, Elizabeth A., et al. "Antimicrobial resistance genes, cassettes, and plasmids present in *Salmonella enterica* associated with United States food animals." *Frontiers in microbiology* 10 (2019): 832.
243. Moura, Alexandra, et al. "INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes." *Bioinformatics* 25.8 (2009): 1096-1098.
244. Partridge, Sally R., et al. "Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons." *FEMS microbiology reviews* 33.4 (2009): 757-784.

245. Tolmasky, Marcelo E., and Jorge H. Crosa. "Genetic Organization of Antibiotic Resistance Genes (aac (6')-Ib, aadA, and oxa9) in the Multiresistance Transposon Tn1331." *Plasmid* 29.1 (1993): 31-40.
246. Recchia, Gavin D., and Ruth M. Hall. "Gene cassettes: a new class of mobile element." *Microbiology* 141.12 (1995): 3015-3027.
247. Wylie, B. A., and H. J. Koornhof. "Nucleotide sequence of dihydrofolate reductase type VI." *Journal of medical microbiology* 35.4 (1991): 214-218.
248. van Essen-Zandbergen, Alieda, et al. "Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59.4 (2007): 746-750.
249. Janecko, Nicol, et al. "Prevalence, Characterization and Antibiotic Resistance of *Salmonella* Isolates in Large Poultry Species of Europe and North America Between 2010 and 2013." *Zoonoses and public health* 62.4 (2015): 292-300.
250. Switt, Andrea I. Moreno, et al. "Salmonella phages and prophages: genomics, taxonomy, and applied aspects." *Salmonella* (2015): 237-287.
251. Canchaya, Carlos, et al. "Phage as agents of lateral gene transfer." *Current opinion in microbiology* 6.4 (2003): 417-424.
252. Mirolid, Susanne, et al. "Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella* typhimurium strain." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96.17 (1999): 9845-9850.
253. Bossi, Lionello, and Nara Figueroa-Bossi. "Prophage arsenal of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology* (2005): 165-P7.
254. Schönenbrücher, Vanessa, Edward T. Mallinson, and Michael Bülte. "A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* species including three new chromogenic plating media." *International journal of food microbiology* 123.1-2 (2008): 61-66.
255. Gorski, Lisa. "Selective enrichment media bias the types of *Salmonella enterica* strains isolated from mixed strain cultures and complex enrichment broths." *PLoS One* 7.4 (2012): e34722.

256. Agbaje, M., et al. "Evolution of Salmonella nomenclature: a critical note." *Folia microbiologica* 56.6 (2011): 497-503.
257. Uyttendaele, Mieke, Katrien Vanwildemeersch, and Johan Debevere. "Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of Salmonella." *Letters in applied microbiology* 37.5 (2003): 386-391.
258. Kumar, R., P. K. Surendran, and N. Thampuran. "Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of Salmonella in seafood." *Letters in applied microbiology* 46.2 (2008): 221-226.
259. Kadri, Karim. "Polymerase chain reaction (PCR): principle and applications." *Synthetic Biology-New Interdisciplinary Science*. IntechOpen, 2019.
260. Klein, Dieter. "Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations." *Trends in molecular medicine* 8.6 (2002): 257-260.
261. Joshi, Mohini, and J. D. Deshpande. "Polymerase chain reaction: methods, principles and application." *International Journal of Biomedical Research* 2.1 (2010): 81-97.
262. Zhang, Tong, and Herbert HP Fang. "Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples." *Applied Microbiology and Biotechnology* 70.3 (2006): 281-289.
263. Markoulatos, P., N. Siafakas, and M. Moncany. "Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach." *Journal of clinical laboratory analysis* 16.1 (2002): 47-51.
264. Mira, Alex, Lisa Klasson, and Siv GE Andersson. "Microbial genome evolution: sources of variability." *Current opinion in microbiology* 5.5 (2002): 506-512.
265. Stanley, Theresa L., Craig D. Ellermeier, and James M. Slauch. "Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects Salmonella enterica serovar Typhimurium survival in Peyer's patches." *Journal of bacteriology* 182.16 (2000): 4406-4413.

266. Mmolawa, Princess T., et al. "Temperate phages in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: implications for epidemiology." *International Journal of Medical Microbiology* 291.8 (2002): 633-644.
267. Osman, Kamelia M., et al. "Isolation and characterization of *Salmonella enterica* in day-old ducklings in Egypt." *Pathogens and global health* 108.1 (2014): 37-48.
268. Borges, Karen A., et al. "Detection of virulence-associated genes in *Salmonella Enteritidis* isolates from chicken in South of Brazil." *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 33.12 (2013): 1416-1422.
269. Wagner, Carolin, and Michael Hensel. "Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*." *Bacterial adhesion* (2011): 17-34.
270. White, Aaron P., et al. "Structure and characterization of AgfB from *Salmonella enteritidis* thin aggregative fimbriae." *Journal of molecular biology* 311.4 (2001): 735-749.
271. Amini, Kumarss, et al. "Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in Iran." *African Journal of Microbiology Research* 4.21 (2010): 2202-2210.
272. Hong, Yang, et al. "Rapid screening of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles." *BMC microbiology* 8.1 (2008): 1-8.
273. Ahmed, Ashraf M., Amjad IA Hussein, and Tadashi Shimamoto. "Proteus mirabilis clinical isolate harbouring a new variant of *Salmonella* genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region." *Journal of antimicrobial chemotherapy* 59.2 (2007): 184-190.
274. Bennett, Peter M. "Integrations and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43.1 (1999): 1-4.
275. Targant, Hayette, et al. "IS 6100-mediated genetic rearrangement within the complex class 1 integron In104 of the *Salmonella* genomic island 1." *Journal of antimicrobial chemotherapy* 65.7 (2010): 1543-1545.

276. Stalder, Thibault, et al. "Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance." *Frontiers in microbiology* 3 (2012): 119.
277. Poirel, Laurent, et al. "Integron mobilization unit as a source of mobility of antibiotic resistance genes." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53.6 (2009): 2492-2498.
278. Kittell, Barbara Lewis, and Donald R. Helinski. "Plasmid incompatibility and replication control." *Bacterial conjugation*. Springer, Boston, MA, 1993. 223-242.
279. Humbert, Malika, et al. "Entry exclusion of conjugative plasmids of the IncA, IncC, and related untyped incompatibility groups." *Journal of bacteriology* 201.10 (2019).
280. Kesamang, Monamodi, and Teddie O. Rahube. "In silico detection and correlative analysis of antibiotic resistance plasmid-incompatibility (Inc/rep) groups from different environments." *ISABB Journal of Biotechnology and Bioinformatics* 4.1 (2019): 1-13.
281. Mezal, Ezat H., et al. "Isolation and molecular characterization of Salmonella enterica serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010." *Food microbiology* 38 (2014): 67-74.
282. Matuschek, Erika, Derek FJ Brown, and Gunnar Kahlmeter. "Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories." *Clinical Microbiology and Infection* 20.4 (2014): O255-O266.
283. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M02-A10 (ISBN 1-56238-688-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2009.
284. Гаркавенко, Т. О., Н. Я. Мех, and К. А. Скоробрищук. "Альтернативний експрес-метод виявлення сальмонел у харчових продуктах та кормах методом ПЛР із використанням системи та наборів реагентів BAX®." *Ветеринарна біотехнологія* 26 (2015): 51-57.

285. Whiley, Harriet, and Kirstin Ross. "Salmonella and eggs: from production to plate." *International journal of environmental research and public health* 12.3 (2015): 2543-2556.
286. Morya, Sonia, A. E. D. D. Amoah, and Stefan Orn Snaebjornsson. "Food poisoning hazards and their consequences over food safety." *Microorganisms for Sustainable Environment and Health* 383 (2020).
287. Rahman, Md Atikur, et al. "Isolation, identification and antibiotic sensitivity pattern of Salmonella spp. from locally isolated egg samples." *Am. J. Pure Appl. Sci* 1.1 (2019): 1-11.
288. Sánchez-Vargas, Flor M., Maisam A. Abu-El-Haija, and Oscar G. Gómez-Duarte. "Salmonella infections: an update on epidemiology, management, and prevention." *Travel medicine and infectious disease* 9.6 (2011): 263-277.
289. Quan, Guomei, et al. "Fimbriae and related receptors for Salmonella Enteritidis." *Microbial pathogenesis* 126 (2019): 357-362.
290. Rajashekara, Gireesh, et al. "Pathogenic role of SEF14, SEF17, and SEF21 fimbriae in Salmonella enterica serovar Enteritidis infection of chickens." *Applied and environmental microbiology* 66.4 (2000): 1759-1763.
291. Wray, Clifford, and A. Wray, eds. *Salmonella in domestic animals*. Cabi, 2000.
292. Shome, Arijit, et al. "Isolation and Identification of Periplasmic Proteins in Salmonella Typhimurium." *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 9.6 (2020): 1923-1936.
293. Ogunniyi, Abiodun D., et al. "Role of SefA subunit protein of SEF14 fimbriae in the pathogenesis of Salmonella enterica serovar Enteritidis." *Infection and immunity* 65.2 (1997): 708-717.
294. Clouthier, Sharon C., et al. "Characterization of three fimbrial genes, sefABC, of Salmonella enteritidis." *Journal of Bacteriology* 175.9 (1993): 2523-2533.
295. Kumar, S., K. Balakrishna, and H. V. Batra. "Detection of Salmonella enterica serovar Typhi (S. Typhi) by selective amplification of invA, viaB, fliC-d and prt genes by polymerase chain reaction in mutiplex format." *Letters in applied microbiology* 42.2 (2006): 149-154.

296. Yang, Qianru, Kelly J. Domesle, and Beilei Ge. "Loop-mediated isothermal amplification for Salmonella detection in food and feed: current applications and future directions." *Foodborne pathogens and disease* 15.6 (2018): 309-331.
297. Ravan, Hadi, and Razieh Yazdanparast. "Development of a new loop-mediated isothermal amplification assay for prt (rfbS) gene to improve the identification of Salmonella serogroup D." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28.5 (2012): 2101-2106.
298. Рубленко, Н. М., et al. "Виявлення та аналіз поширення генів помірних бактеріофагів у штаммах Salmonella enterica." *Науковий вісник ветеринарної медицини* 1 (2016): 95-102.
299. Рубленко, Наталія Михайлівна, Головка, Анатолій Миколайович, Дерябін, Олег Миколайович. "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* 20.83 (2018).
300. Фотіна, Г. А., and Ж. Є. Кліщова. "Чутливість збудників бактеріальних хвороб птиці до антибактеріальних препаратів." *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького. Серія: Ветеринарні науки* 18, № 3 (71) (2016): 182-185.
301. Рубленко Наталія Михайлівна, Головка, Анатолій Миколайович. "Чутливість до антибактеріальних препаратів у ізолятів Salmonella enterica subsp. enterica, виділених на території України в 2014–2017." *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки* 22.97 (2020): 58-68.
302. Davies, Emily V., et al. "Temperate phages both mediate and drive adaptive evolution in pathogen biofilms." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.29 (2016): 8266-8271.

303. Вовк, Оксана Олексіївна, et al. "Бактеріофаги: нова парадигма та переваги перед антибіотиками у лікувально-профілактичних цілях." *Наукоємні технології* 2 (2017): 150-157.
304. Шевченко Т. П., Будзанівська І. Г., Поліщук В. П.. Віруси мікроорганізмів. Курс лекцій: Навчальний посібник. Київ: Глобус, 2013.
305. Clokie, Martha RJ, and A. Kropinski. "Methods and protocols, Bacteriophages. Volume 1: Isolation, characterization, and interactions." *Methods in molecular biology*". *Humana press* (2009): 69-81.
306. Jain, R. Horizontal gene transfer in microbial genome evolution / Jain, R., Rivera, M. C., Moore, J. E., Lake, J. A // *Theoretical population biology*. – 2002. – Vol. 61(4). P. - 489-495.
307. Hanlon, G. W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections // *International journal of antimicrobial agents*. – 2007. – Vol., 30(2). P. – 118-128.
308. Clokie, Martha RJ, and A. Kropinski. "Methods and protocols, volume 1: Isolation, characterization, and interactions." *Methods in molecular biology*". *Humana press* (2009): 69-81.
309. Schicklmaier, Petra, et al. "A comparative study on the frequency of prophages among natural isolates of Salmonella and Escherichia coli with emphasis on generalized transducers." *Antonie Van Leeuwenhoek* 73.1 (1998): 49-54.
310. Miold, Susanne, et al. "Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic Salmonella typhimurium strain." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96.17 (1999): 9845-9850.
311. Schatten, Heide, Abe Eisenstark, and Abraham Eisenstark, eds. *Salmonella: methods and protocols*. Springer Science & Business Media, 2007.
312. Kubori, Tomoko, et al. "Molecular characterization and assembly of the needle complex of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.18 (2000): 10225-10230.

313. Hensel, Michael, et al. "Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages." *Molecular microbiology* 30.1 (1998): 163-174.
314. Рубленко, Н. М., О. М. Дерябін, and А. М. Головко. "Індукція помірних фагів у *Salmonella enterica* subsp. *enterica* з використанням Мітоміцину С." *Ветеринарна біотехнологія* 32 (1) (2018): 232-238.
315. Стегній, Б. Т., et al. "Динаміка формування імунної відповіді у курей після щеплення інактивованою бівалентною вакциною проти сальмонельозу птиці." *Ветеринарна біотехнологія* 32 (1) (2018): 265-271.
316. Merino, Lina, et al. "Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies." *Food Research International* 119 (2019): 530-540.
317. European Food Safety Authority (EFSA). "Quantitative estimation of the impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in breeding hens of *Gallus gallus*." *EFSA Journal* 7.4 (2009): 1036.
318. Hyeon, Ji-Yeon, et al. "Rapid detection of *Salmonella* in poultry environmental samples using real-time PCR coupled with immunomagnetic separation and whole genome amplification." *Poultry science* 98.12 (2019): 6973-6979.
319. Dullaert-de Boer, Maria, et al. "Selenite enrichment broth to improve the sensitivity in molecular diagnostics of *Salmonella*." *Journal of microbiological methods* 157 (2019): 59-64.
320. Рубленко, Наталія Михайлівна. 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. \
321. Majowicz, Shannon E., et al. "The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis." *Clinical infectious diseases* 50.6 (2010): 882-889.

322. Stanaway, Jeffrey D., et al. "The global burden of non-typhoidal salmonella invasive disease: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017." *The Lancet Infectious Diseases* 19.12 (2019): 1312-1324.
323. Pugliese, N., et al. "Circulation dynamics of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum biovar Gallinarum in a poultry farm infested by *Dermanyssus gallinae*." *Medical and veterinary entomology* 33.1 (2019): 162-170.
324. Shivaprasad, H. L. "Fowl typhoid and pullorum disease." *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 19.2 (2000): 405-424.
325. Lee, Kyung-Min, et al. "Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety." *Food control* 47 (2015): 264-276.
326. Iannetti, Luigi, et al. "Animal welfare and microbiological safety of poultry meat: Impact of different at-farm animal welfare levels on at-slaughterhouse *Campylobacter* and *Salmonella* contamination." *Food Control* 109 (2020): 106921.
327. Jia, Siyuan, et al. "Challenges in Vaccinating Layer Hens against *Salmonella Typhimurium*." *Vaccines* 8.4 (2020): 696.
328. Li, Xinghua, et al. "Evaluation of genetic resistance to *Salmonella Pullorum* in three chicken lines." *Poultry science* 97.3 (2018): 764-769.
329. Li, Qiuchun, et al. "Purification of recombinant IpaJ to develop an indirect ELISA-based method for detecting *Salmonella enterica* serovar Pullorum infections in chickens." *BMC veterinary research* 15.1 (2019): 1-7.
330. Xu, Lijuan, et al. "A rapid method to identify *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum using a specific target gene ipaJ." *Avian pathology* 47.3 (2018): 238-244.
331. Xiong, Dan, et al. "Identification and discrimination of *Salmonella enterica* serovar gallinarum biovars pullorum and gallinarum based on a one-step multiplex PCR assay." *Frontiers in microbiology* 9 (2018): 1718.
332. Berhanu, Gemechu, and Abdisa Fulasa. "Pullorum Disease and Fowl Typhoid in Poultry: A Review." *British Journal of Poultry Sciences* 9.3 (2020): 48-56.

333. Cheng, Yiluo, et al. "Evaluation of young chickens challenged with aerosolized *Salmonella Pullorum*." *Avian Pathology* 49.5 (2020): 507-514.
334. Zhou, Chenyu, et al. "The effect of a selected yeast fraction on the prevention of pullorum disease and fowl typhoid in commercial breeder chickens." *Poultry science* 99.1 (2020): 101-110.
335. Zhang, Rui, et al. "The eradication effects of pullorum disease on chicken flocks mortality in 297 large-scale farms in China." *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Vol. 705. No. 1. IOP Publishing, 2021.
336. Guo, Rongxian, et al. "Evaluation of protective efficacy of a novel inactivated *Salmonella Pullorum* ghost vaccine against virulent challenge in chickens." *Veterinary immunology and immunopathology* 173 (2016): 27-33.
337. Berchieri Jr, A., et al. "Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars *Pullorum* and *Gallinarum* in chickens: effect of bacterial and host genetic background." *Avian pathology* 30.3 (2001): 221-231.
338. Geng, Shizhong, et al. "The SseL protein inhibits the intracellular NF- κ B pathway to enhance the virulence of *Salmonella Pullorum* in a chicken model." *Microbial pathogenesis* 129 (2019): 1-6.
339. Anderson, Lowell A., David A. Miller, and Darrell W. Trampel. "Epidemiological investigation, cleanup, and eradication of pullorum disease in adult chickens and ducks in two small-farm flocks." *Avian diseases* 50.1 (2006): 142-147.
340. Christensen, J. P., et al. "Characterization of *Salmonella enterica* serovar *gallinarum* biovars *gallinarum* and *pullorum* by plasmid profiling and biochemical analysis." *Avian Pathology* 21.3 (1992): 461-470.
341. Paiva, J. B., et al. "Molecular differentiation of *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum* by RFLP of *fliC* gene from Brazilian isolates." *Brazilian Journal of Poultry Science* 11.4 (2009): 271-275.

342. Kwon, Hyuk-Joon, et al. "Differentiation of *Salmonella enterica* serotype gallinarum biotype pullorum from biotype gallinarum by analysis of phase 1 flagellin C gene (fliC)." *Journal of microbiological methods* 40.1 (2000): 33-38.
343. Batista, Diego Felipe Alves, et al. "Polymerase chain reaction assay based on ratA gene allows differentiation between *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25.2 (2013): 259-262.
344. Cheraghchi, Narges, et al. "Identification of isolated *Salmonella enterica* serotype gallinarum biotype pullorum and gallinarum by PCR-RFLP." *Jundishapur journal of microbiology* 7.9 (2014).
345. Shah, Devendra H., et al. "Allele-specific PCR method based on rfbS sequence for distinguishing *Salmonella gallinarum* from *Salmonella pullorum*: serotype-specific rfbS sequence polymorphism." *Journal of microbiological methods* 60.2 (2005): 169-177.
346. Kang, Min-Su, et al. "Differential identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of glgC and speC genes." *Veterinary microbiology* 147.1-2 (2011): 181-185.
347. Ren, Xingxing, et al. "High resolution melting (HRM) analysis as a new tool for rapid identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Pullorum and Gallinarum." *Poultry science* 96.5 (2017): 1088-1093.
348. Dallman, Tim, et al. "Phylogenetic structure of European *Salmonella* Enteritidis outbreak correlates with national and international egg distribution network." *Microbial genomics* 2.8 (2016).
349. Hörmansdorfer, Stefan, et al. "Re-evaluation of a 2014 multi-country European outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 14b using recent epidemiological and molecular data." *Eurosurveillance* 22.50(2017): 17-00196.
350. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). "The European Union one health 2018 zoonoses report." *EFSA Journal* 17.12 (2019): e05926.

351. Inns, Thomas, et al. "Prospective use of whole genome sequencing (WGS) detected a multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis." *Epidemiology & Infection* 145.2 (2017): 289-298.
352. Acheson D., Hohmann E. L.. "Nontyphoidal salmonellosis." *Clinical Infectious Diseases* 32.2 (2001): 263-269.
353. Owusu-Ofori, Alex, and W. Michael Scheld. "Treatment of Salmonella meningitis: two case reports and a review of the literature." *International journal of infectious diseases* 7.1 (2003): 53-60.
354. Adhikary, R., Joshi, S., & Ramakrishnan, M. (2013). Salmonella typhimurium meningitis in infancy. *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 17(6), 392.
355. Emmerson, A. M., and A. M. Jones. "The quinolones: decades of development and use." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51.suppl_1 (2003): 13-20.
356. Briggs, C. E., Fratamico P. M. "Molecular Characterization of an Antibiotic Resistance Gene Cluster of Salmonella typhimurium DT104." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43.4 (1999): 846-849.
357. Begum, K., Mannan S. J., Ahmed A. "Antibiotic resistance, plasmids and integron profile of Salmonella species isolated from poultry farm and patients." *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences* 15.2 (2016): 209-214.
358. Bilge N., Vatansever L., Sezer C. "Antibiotic resistance of Salmonella spp. isolated from raw chicken wings." *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 24.3 (2018).
359. Tadesse, Getachew, et al. "Molecular epidemiology of fluoroquinolone resistant Salmonella in Africa: A systematic review and meta-analysis." *PLoS One* 13.2 (2018): e0192575.
360. Bythwood, Tameka N., et al. "Antimicrobial resistant Salmonella enterica Typhimurium colonizing chickens: the impact of plasmids, genotype, bacterial communities, and antibiotic administration on resistance." *Frontiers in Sustainable Food Systems* 3 (2019): 20.

361. Carattoli, Alessandra. "Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*." *Current issues in molecular biology* 5.4 (2003): 113-122.
362. Hakanen, Antti J., et al. "New quinolone resistance phenomenon in *Salmonella enterica*: nalidixic acid-susceptible isolates with reduced fluoroquinolone susceptibility." *Journal of clinical microbiology* 43.11 (2005): 5775-5778.
363. Piekarska, Katarzyna, et al. "Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical Enterobacteriaceae isolated in a tertiary hospital in Warsaw, Poland." *International journal of antimicrobial agents* 45.3 (2015): 238-243.
364. Martínez-Martínez L. et al. "Quinolone resistance from a transferable plasmid." *The Lancet* 351.9105 (1998): 797-799.
365. Poirel L., Cattoir V., Nordmann P. "Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies." *Frontiers in microbiology* 3 (2012): 24.
366. Глєбова, К. В., Бобровицька І. А., Майборода О. В. "Моніторинг сальмонельозу дикої птиці півдня України." *Ветеринарна медицина* 99 (2014): 83-86.
367. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2013. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal* 2013;11(5):3196, 359 pp.
368. Akinyemi, K. O., et al. "Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Salmonella enterica* serovars from different sources in Lagos, Nigeria." *Health* 10.6 (2018): 758-772.
369. Jaja, Ishmael Festus, et al. "Molecular characterisation of antibiotic-resistant *Salmonella enterica* isolates recovered from meat in South Africa." *Acta tropica* 190 (2019): 129-136.
370. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. EU Summary Report on antimicrobial

resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA Journal 2015;13(2):4036, 178 pp.

371. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. EFSA Journal 2018;16 (2):5182, 270 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5182>

372. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2019. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. EFSA Journal 2019;17 (2):5598, 278 pp.

373. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA Journal 2015; 13 (2), 4036,

374. Le Hello S. et al. "The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 strain." *Frontiers in Microbiology* 4 (2013): 395.

375. Veldman, Kees, et al. "International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66.6 (2011): 1278-1286.

376. Karp, Beth E., et al. "Plasmid-mediated quinolone resistance in human non-typhoidal *Salmonella* infections: An emerging public health problem in the United States." *Zoonoses and public health* 65.7 (2018): 838-849.

377. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. EFSA Journal 2018; 16 (2), 5182.

378. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2019. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA Journal* 2019; 17 (2), 5598.
379. Galan, Jorge E., Christine Ginocchio, and Paul Costeas. "Molecular and functional characterization of the Salmonella invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family." *Journal of bacteriology* 174.13 (1992): 4338-4349.
380. Rahn, K., et al. "Amplification of an *invA* gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella." *Molecular and cellular probes* 6.4 (1992): 271-279.
381. Galán, J.E., Curtiss R. I. "Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of Salmonella typhimurium among other Salmonella serovars: *invA* mutants of Salmonella typhi are deficient for entry into mammalian cells." *Infection and immunity* 59.9 (1991): 2901-2908.
382. Stevens, J.A. et al. "Complete and assembled genome sequence of Salmonella enterica subsp. enterica serotype Senftenberg N17-509, a strain lacking Salmonella pathogen Island 1." *Genome announcements* 6.12 (2018).
383. Sévellec, Yann, et al. "Polyphyletic nature of Salmonella enterica serotype Derby and lineage-specific host-association revealed by genome-wide analysis." *Frontiers in Microbiology* 9 (2018): 891.
384. Bai Jianfa, et al. "A multiplex real-time PCR assay, based on *invA* and *pagC* genes, for the detection and quantification of Salmonella enterica from cattle lymph nodes." *Journal of microbiological methods* 148 (2018): 110-116.
385. Guo Jiubiao, et al. "Development of a novel quantum dots and graphene oxide based FRET assay for rapid detection of *invA* gene of Salmonella." *Frontiers in microbiology* 8 (2017): 8.
386. Zhang Z. et al. "Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* and Salmonella spp. in raw shrimp." *Food Control* 51 (2015): 31-36.

387. Delbeke S., et al. "Multiplex real-time PCR and culture methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* Thompson in strawberries, a lettuce mix and basil." *International journal of food microbiology* 193 (2015): 1-7.
388. Malorny B. et al. "Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard." *Applied and environmental microbiology* 69.1 (2003): 290-296.
389. McQuiston, J. R., et al. "Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*." *Journal of clinical microbiology* 42.5 (2004): 1923-1932.
390. Yamaguchi, Tomoko, et al. "Structural and functional comparison of *Salmonella* flagellar filaments composed of *FljB* and *FliC*." *Biomolecules* 10.2 (2020): 246.
391. Bonifield, Heather R., and Kelly T. Hughes. "Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism." *Journal of bacteriology* 185.12 (2003): 3567-3574.
392. Pearce M. E. et al. "Comparative analysis of core genome MLST and SNP typing within a European *Salmonella* serovar Enteritidis outbreak." *International journal of food microbiology* 274 (2018): 1-11.
393. Kang, Ho Young, et al. "An efficient secretion of the protein fused to the *AgfA* signal sequence in *Salmonella*." *African Journal of Biotechnology* 10.55 (2011): 11611-11619.
394. Misselwitz, Benjamin, et al. "*Salmonella enterica* serovar Typhimurium binds to HeLa cells via Fim-mediated reversible adhesion and irreversible type three secretion system 1-mediated docking." *Infection and immunity* 79.1 (2011): 330-341.
395. Henriques A. et al. "Reducing *Salmonella* horizontal transmission during egg incubation by phage therapy." *Foodborne pathogens and disease* 10.8 (2013): 718-722.

396. Petersen, Jörn. "Phylogeny and compatibility: plasmid classification in the genomics era." *Archives of microbiology* 193.5 (2011): 313-321.
397. Bertini, Alessia, et al. "Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54.10 (2010): 4168-4177.
398. Gillings M. R. "Integrins: past, present, and future." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78.2 (2014): 257-277.
399. Roth A., Breaker R. "Integron attI1 sites, not riboswitches, associate with antibiotic resistance genes." *Cell* 153.7 (2013): 1417-1418.
400. Krauland M. et al. "Novel integron gene cassette arrays identified in a global collection of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella enterica*." *Current microbiology* 60.3 (2010): 217-223.
401. Ranjbar, Reza, et al. "The prevalence of virulence *sodC1* and *sopE1* genes among the clinical serotypes of *Salmonella enterica* in Tehran, Iran." *Journal Mil Med* 16.3 (2014): 125-131.
402. Switt, A. et al. "Genomic characterization provides new insight into *Salmonella* phage diversity." *BMC genomics* 14.1 (2013): 1-15.
403. Cardenal-Muñoz E., Ramos-Morales F. "Analysis of the expression, secretion and translocation of the *Salmonella enterica* type III secretion system effector *SteA*." *PLoS One* 6.10 (2011): e26930.
404. Rosselin M et al. "Heterogeneity of type III secretion system (T3SS)-1-independent entry mechanisms used by *Salmonella Enteritidis* to invade different cell types." *Microbiology* 157.3 (2011): 839-847.
405. Que F. et al. "*Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) at work." *Current microbiology* 66.6 (2013): 582-587.
406. Kaur J., Jain S. K. "Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis." *Microbiological research* 167.4 (2012): 199-210.

407. Walmagh, Maarten, et al. "Characterization of modular bacteriophage endolysins from Myoviridae phages OBP, 201φ2-1 and PVP-SE1." *PLoS One* 7.5 (2012): e36991.
408. Santos, Sílvia B., et al. "Genomic and proteomic characterization of the broad-host-range Salmonella phage PVP-SE1: creation of a new phage genus." *Journal of Virology* 85.21 (2011): 11265-11273.
409. Ammendola, Serena, et al. "Differential contribution of sodC1 and sodC2 to intracellular survival and pathogenicity of Salmonella enterica serovar Choleraesuis." *Microbes and infection* 7.4 (2005): 698-707.
410. Akhtar, Mastura, Stelios Viazis, and Francisco Diez-Gonzalez. "Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against Salmonella enterica serovars." *Food Control* 38 (2014): 67-74.
411. Bao, Hongduo, et al. "Bio-control of Salmonella Enteritidis in foods using bacteriophages." *Viruses* 7.8 (2015): 4836-4853.
412. Sillankorva, Sanna, et al. "Salmonella Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry." *Journal of applied microbiology* 108.4 (2010): 1175-1186.
413. Knodler, Leigh A., et al. "Coiled-coil domains enhance the membrane association of Salmonella type III effectors." *Cellular microbiology* 13.10 (2011): 1497-1517.
414. Buehler, Ariel J., et al. "Evaluation of invA diversity among Salmonella species suggests why some commercially available rapid detection kits may fail to detect multiple Salmonella subspecies and species." *Journal of food protection* 82.4 (2019): 710-717.
415. Sansone, Assunta, et al. "The role of two periplasmic copper-and zinc-cofactored superoxide dismutases in the virulence of Salmonella choleraesuis." *Microbiology* 148.3 (2002): 719-726.

416. Graziani, Caterina, et al. "Virulotyping of Salmonella enterica serovar Napoli strains isolated in Italy from human and nonhuman sources." *Foodborne pathogens and disease* 8.9 (2011): 997-1003.

ДОДАТКИ

Додаток А**Свідоцтва про первинне депонування польових штамів *Salmonella enterica*****СВІДОЦТВО**

про первинне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Кому видано: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму ***Salmonella typhimurium* L1**

первинно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного
інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: **771**

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: клопотання, паспорт,
акти

Дата первинного депонування: 19.10.2020

Місце зберігання: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і
штамів мікроорганізмів, 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30

М.П.

16.12.2020



А.М. Головка

СВІДОЦТВО

про первинне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Кому видано: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму *Salmonella enteritidis 11*

первинно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного
інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: **768**

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: клопотання, паспорт,
акти

Дата первинного депонування: 19.10.2020

Місце зберігання: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і
штамів мікроорганізмів, 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30

М.П.

16.12.2020



А.М. Головка

СВІДОЦТВО

про первинне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Кому видано: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму **Salmonella typhimurium VM1**

первинно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного
інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: **775**

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: клопотання, паспорт,
акти

Дата первинного депонування: 19.10.2020

Місце зберігання: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і
штамів мікроорганізмів, 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30

М.П.

16.12.2020

 А.М. Головка

СВІДОЦТВО

про первинне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Кому видано: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму **Salmonella virchow L116**

первинно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного
інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: **776**

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: клопотання, паспорт,
акти

Дата первинного депонування: 19.10.2020

Місце зберігання: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і
штамів мікроорганізмів, 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30

М.П.

16.12.2020



А.М. Головка

СВІДОЦТВО

про первинне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Кому видано: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму **Salmonella typhimurium Pg1**

первинно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного
інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: **773**

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: клопотання, паспорт,
акти

Дата первинного депонування: 19.10.2020

Місце зберігання: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і
штамів мікроорганізмів, 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30

М.П.

16.12.2020



А.М. Головка

СВІДОЦТВО

про первинне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Кому видано: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму **Salmonella typhimurium PN**

первинно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного
інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: **774**

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: клопотання, паспорт,
акти

Дата первинного депонування: 19.10.2020

Місце зберігання: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і
штамів мікроорганізмів, 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30

М.П.

16.12.2020



А.М. Головка

СВІДОЦТВО

про первинне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Кому видано: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму *Salmonella enteritidis S1*

первинно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного
інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: 770

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: клопотання, паспорт,
акт

Дата первинного депонування: 19.10.2020

Місце зберігання: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і
штамів мікроорганізмів, 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30

М.П.

16.12.2020



А.М. Головка

СВІДОЦТВО

про первинне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Кому видано: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму **Salmonella typhimurium L2**

первинно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного
інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: **772**

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: клопотання, паспорт,
акти

Дата первинного депонування: 19.10.2020

Місце зберігання: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і
штамів мікроорганізмів, 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30

М.П.

16.12.2020



А.М. Головка

СВІДОЦТВО

про первинне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Кому видано: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму *Salmonella enteritidis* PN

первинно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного
інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: 769

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: клопотання, паспорт,
акт

Дата первинного депонування: 19.10.2020

Місце зберігання: Державний науково-контрольний інститут біотехнології і
штамів мікроорганізмів, 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30

М.П.

16.12.2020



А.М. Головка

Додаток Б

Акти впровадження матеріалів дисертаційної роботи у ветеринарну практику та картки зворотнього зв'язку про впровадження матеріалів дисертаційної роботи у навчальний процес і наукові дослідження

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи та інноваційного розвитку
Поліського національного університету

 Романчук Л.Д.

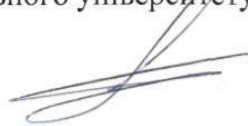
« 30 » грудня 2020 р.

КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи Рубленко Наталії Михайлівни «Детекція факторів патогенності у бактерій *Salmonella spp.* в полімеразній ланцюговій реакції» використовуються в навчальному процесі на кафедрі мікробіології, фармакології та епізоотології при вивченні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія та імунологія» і «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин».

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри протокол №4 від 30 жовтня 2020 року.

Завідувач кафедри мікробіології, фармакології
та епізоотології Поліського національного університету
доктор ветеринарних наук, професор



Галатюк О.Є.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор Білоцерківського національного
аграрного університету, академік
НААН України, професор



А. С. Даниленко

вересня

2020 р.

КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи Рубленко Наталії Михайлівни «Детекція факторів патогенності у бактерій *Salmonella spp.* в полімеразній ланцюговій реакції» використовуються в навчальному процесі за програмою з дисциплін «Епізоотологія та система діагностичних процедур» та «Епізоотологія та інфекційні хвороби» на кафедрі епізоотології та інфекційних хвороб.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри епізоотології та інфекційних хвороб факультету ветеринарної медицини Білоцерківського національного аграрного університету (протокол № 3 від 30.09.2020 року).

Завідувач кафедри епізоотології
та інфекційних хвороб, професор

Б. М. Ярчук



«Затверджую»

Перший проректор –
проректор з навчальної роботи,
професор

« 27 »  Опорієнко Д.М.
2020 р.

«Погоджено»

Проректор з наукової роботи,
професор

 Грицан Ю.І.
« 24 »  2020 р.

КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи Рубленко Наталії Михайлівни «Детекція факторів патогенності у бактерій *Salmonella spp.* в полімеразній ланцюговій реакції» використовуються в навчальному процесі за програмою з дисциплін «Ветеринарна мікробіологія та імунологія» та «Епізоотологія та інфекційні хвороби» на кафедрі епізоотології та інфекційних хвороб тварин.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету (протокол № 3 від 26 жовтня 2020 року).

Декан факультету
ветеринарної медицини,
кандидат ветеринарних наук, доцент



І.А. Бібен

Завідувач кафедри епізоотології
та інфекційних хвороб тварин,
доктор ветеринарних наук, професор



О. А. Ткаченко

Погоджено
Проректор з навчальної і виховної роботи
(підпис)
С.М.Кваша
(Прізвище, ініціали)
« » 2020 р.

Затверджую
Перший проректор
(підпис)
І.І. Ібатулін
(Прізвище, ініціали)
« » 2020 р.

АКТ
про впровадження/використання результатів
докторської дисертаційної роботи
у навчальний процес



Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: **«Детекція факторів патогенності у бактерій *Salmonella spp.* в полімеразній ланцюговій реакції»**, що представлена на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія виконаної **Рубленко Наталією Михайлівною** впроваджено у навчальну програму при викладанні дисциплін «Епізоотологія та інфекційні хвороби», «Спеціальна епізоотологія».

Результати дисертаційної роботи Рубленко Наталії Михайлівни щодо діагностичних особливостей полімеразної ланцюгової реакції щодо індикації бактерій *Salmonella spp.*, та дослідження факторів патогенності збудника сальмонельозу використовуються під час читання лекцій, проведення лабораторних занять, а також під час проведення наукових досліджень на кафедрі епізоотології, мікробіології і вірусології у підготовці фахівців ОС «Бакалавр», «Магістр» за напрямом ветеринарна медицина зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Національному університеті біоресурсів і природокористування України.

Декан факультету,
доктор біологічних наук, професор

Цвіліховський М.І.

Завідувач кафедри,
кандидат ветеринарних наук, доцент

Мельник В.В.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор Білоцерківського національного
аграрного університету, академік
НААН України, професор



«18» вересня 2020 р.

ДОВІДКА ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріали дисертаційної роботи Рубленко Наталії Михайлівни «Детекція факторів патогенності у бактерій *Salmonella spp.* в полімеразній ланцюговій реакції» використовуються на кафедрі лабораторної діагностики у програмах підвищення кваліфікації спеціалістів ветеринарної медицини.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри лабораторної діагностики Інституту післядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини Білоцерківського національного аграрного університету (протокол № 3 від 18.09. 2020).

Завідувач кафедри

лабораторної діагностики ІПНКСВМ

канд. вет. наук, доцент

Царенко Т. М.

Директор ІПНКСВМ

канд. вет. наук, доцент

Мазур Т. Г.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

А. О. Меженський
« 22 » грудня 2020 р.



КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи Рубленко Наталії Михайлівни «Детекція факторів патогенності у бактерій *Salmonella spp.* в полімеразній ланцюговій реакції» використовуються у практичній та науково-дослідній роботі науково-дослідного відділу молекулярно-генетичних досліджень та науково-дослідного епізоотологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів.

Завідувач науково-дослідного
відділу молекулярно-генетичних
досліджень, канд. вет. наук



М.А. Сапачова

Завідувач науково-дослідного
епізоотологічного відділу, канд. вет. наук

М.С. Карпуленко

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор Львівського національного

Університету ветеринарної медицини та

біотехнологій імені С. З. Гжицького, професор

В. В. Стибель

2020 р.



КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи Рубленко Наталії Михайлівни «Детекція факторів патогенності у бактерій *Salmonella spp.* в полімеразній ланцюговій реакції» використовуються в навчальному процесі на кафедрі мікробіології та вірусології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри мікробіології та вірусології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького.

(протокол №7 від 02 грудня 2020 року).

Завідувач кафедри мікробіології
та вірусології доцент

О. С. Калініна

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор Львівського національного
Університету ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького, професор



В. В. Стибель

02 грудня 2020 р.

КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи Рубленко Наталії Михайлівни «Детекція факторів патогенності у бактерій *Salmonella spp.* в полімеразній ланцюговій реакції» використовуються в навчальному процесі на кафедрі епізоотології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького (протокол №10 від 02 грудня 2020 року).

Завідувач кафедри епізоотології,
доктор вет. наук професор

Б. М. Куртяк

Додаток В

Методичні рекомендації, розроблені на основі результатів дисертаційної роботи

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ

ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ
БІОТЕХНОЛОГІЙ І ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

з індикації та диференціації бактерій
роду *Salmonella* за допомогою
полімеразної ланцюгової реакції

Київ
2019

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ВИТЯГ З ПРОТОКОЛУ № 3
засідання Науково-методичної ради Держпродспоживслужби**

04 жовтня 2019 року

м.Київ

ПОСТАНОВИЛИ

Схвалити методичні рекомендації, надані на розгляд Науково-методичній раді Держпродспоживслужби і прийняти до впровадження в практику ветеринарної медицини.

Науковим установам, розробникам методичних рекомендацій, рекомендувати розмістити їх повний зміст на web-сторінці організації.

Рішення прийнято одноголосно.

**Науково-методичні рекомендації, які розглянуті та схвалені на засіданні
Науково-методичної ради Держпродспоживслужби України
від 04.10.2019 № 3**

№ п/п	Назва	Розробники	Рецензенти	Примітки
1.	Індикація та диференціація бактерій роду <i>Salmonella</i> за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.	Рубленко Н.М, Дерябін О.М., Головко А.М.	Герілович А.П. д.вет.н., професор, Ушкалов В.О. д.вет.н., член- кор. НААН	

Голова Науково-методичної
ради Держпродспоживслужби


А.М. Головко

Секретар Науково-методичної
ради Держпродспоживслужби


О.П. Кудрявченко

Додаток В

Відомості про апробацію результатів дисертації

Матеріали дисертаційної роботи доповідалися, обговорювалися та були схвалені на науково-практичних конференціях та симпозіумах:

- Rublenko N.M., Deriabin O.M., Pinchuk N.G., Golovko A.M. (2016). 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, 52. (Дисертантка провела аналіз наукової літератури, виконала експериментальну частину досліджень).
- Rublenko N.M., Deriabin O.M., Pinchuk N.G., Golovko A.M. (2017). 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, 148.
- Рубленко Н.М., Дерябін О. М., Головко А. М. (2019). Молекулярна характеристика ізолятів *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Enteritidis*, виділених від птиці. Міжнародна науково-практична конференція “Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту” за напрямками: “Актуальні проблеми ветеринарної медицини”, м. Біла Церква.

Додаток Г

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Рубленко, Н. М., Дерябін, О. М., Головка, А. М., Пінчук, Н. Г. (2016). Виявлення та аналіз поширення генів помірних бактеріофагів у штаммах *Salmonella enterica*. *Науковий вісник ветеринарної медицини*, (1), 95-102.
2. Рубленко, Н. М., Головка, А. М., Дерябін, О. М. (2018). 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 СЗ Гжицького*, 20(83). 405-410.
3. Рубленко, Н. М., Дерябін, О. М., Головка, А. М. (2018). Індукція помірних фагів у *Salmonella enterica subsp. enterica* з використанням Мітоміцину С. *Ветеринарна біотехнологія*, (32 (1)), 232-238.
4. Рубленко Н. М. (2018) Молекулярно-генетичні механізми виживання і резистентності сальмонел. *Науковий вісник ветеринарної медицини: Епізоотологія та інфекційні хвороби* 22(2018), 6-12.
5. Рубленко Н. М., Головка А. М. Чутливість до антибактеріальних препаратів у ізолятів *Salmonella enterica subsp. enterica*, виділених на території України в 2014–2017 рр. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні Науки* 22.97 (2020): 58-68.
6. Рубленко Н. М., Дерябін О. М., Головка А. 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.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Тези наукових доповідей:

7. Rublenko N.M., Deriabin O.M., Pinchuk N.G., Golovko A.M. (2016). 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, 52.
8. Rublenko N.M., Deriabin O.M., Pinchuk N.G., Golovko A.M. (2017). 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, 148.
9. Рубленко Н.М., Дерябін О. М., Головко А. М. (2019). Молекулярна характеристика ізолятів *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Enteritidis*, виділених від птиці. *Міжнародна науково-практична конференція “Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту” за напрямками: “Актуальні проблеми ветеринарної медицини”*, м. Біла Церква.

Методичні рекомендації:

10. Рубленко Н. М., Дерябін О. М., Головко О. М. Методичні рекомендації з індикації та диференціації бактерій роду *Salmonella* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Київ, 2019. 14 с.