 © Авторы статьи / Authors of the article

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ И ИММУНОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ/INFECTIOUS DISEASES AND ANIMAL IMMUNOLOGY

DOI: https://doi.org/10.60797/IRJ.2026.173.71 EDN: LTIBFV

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК САЛЬМОНЕЛЛ МЕТОДОМ ПЦР

Научная статья

Терлецкий В.П.[1, *]
[1] ORCID : 0000-0003-4043-3823;
[1] Ленинградский государственный университет имени А. С. Пушкина, Пушкин, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (valeriter[at]mail.ru)

Предложена: 20.07.2026; Принята: 22.10.2026; Опубликована: 17.11.2026

Аннотация

Сальмонеллез птиц остается актуальной проблемой ветеринарной медицины. Диагностику заболевания проводят с помощью биохимических тестов при культивировании бактерии, серодиагностики на наличие специфических соматического и жгутикового антигенов и полимеразной цепной реакции на выявление ДНК возбудителя. Актуальным является определение чувствительности ПЦР-анализа, так как в биологическом материале может присутствовать незначительные количества патогена. В работе использовали разные разведения ДНК для определения порога чувствительности анализа. Показано, что амплификация длинного фрагмента в 2058 пар оснований чувствительна к наличию ингибиторов и требует значительного количества клеток патогена. Наиболее чувствительным способом детекции сальмонелл является вариант ПЦР с использованием праймеров, дающих короткий амплификат в 284 пары оснований. В этом случае удается получить четкий сигнал даже в образцах, содержащих 20 копий геномной ДНК сальмонеллы.

Ключевые слова: сальмонелла, полимеразная цепная реакция, чувствительность, фрагмент ДНК.

SENSITIVITY OF THE PCR METHOD FOR THE DETECTION OF SALMONELLA GENOMIC DNA

Research article

Terletskiy V.P.[1, *]
[1] ORCID : 0000-0003-4043-3823;
[1] Pushkin Leningrad State University, Pushkin, Russian Federation

* Corresponding author (valeriter[at]mail.ru)

Suggested: 20.07.2026; Accepted: 22.10.2026; Published: 17.11.2026

Abstract

Salmonellosis in birds remains a topical problem in veterinary medicine. The disease is diagnosed using biochemical tests with bacterial culture, serological testing for the presence of specific somatic and flagellar antigens, and polymerase chain reaction (PCR) to detect the pathogen's DNA. Determining the sensitivity of the PCR assay is of particular importance, as only trace amounts of the pathogen may be present in the biological material. In this research, various DNA dilutions were used to determine the assay's sensitivity threshold. It was shown that the amplification of a long fragment of 2,058 base pairs is sensitive to the presence of inhibitors and requires a significant number of pathogen cells. The most sensitive method for detecting Salmonella is a PCR variant using primers that yield a short amplificate of 284 base pairs. In this case, a clear signal can be obtained even in samples containing 20 copies of Salmonella genomic DNA.

Keywords: Salmonella, polymerase chain reaction, sensitivity, DNA fragment.

Введение

Контроль эпизоотической ситуации по сальмонеллезу является важной составной частью ветеринарно-санитарных мероприятий в птицехозяйствах [1]. В последнее время структура сальмонеллезов у птиц изменилась в плане снижения доли хозяин-адаптированных серотипов в сторону увеличения частоты встречаемости у птиц других серотипов, ранее адаптированных к другим видам животных. Сейчас от птиц очень часто выделяют серотип S.enterica — S. enteritidis, которая является возбудителем заболеваний у людей, свиней и других млекопитающих. Данный серотип адаптировался к иммунной системе кур, индеек и водоплавающих птиц. С биологической точки зрения *S.enterica* относится к семейству энтеробактерий (Enterobacteriaceae) роду сальмонелл. Периодически регистрируемые вспышки инфекции отмечаются на птицефабриках и у обслуживающего персонала. В последнем случае отмечается тяжело протекающая острая кишечная инфекция. Кроме того, сальмонеллы довольно часто определяются и в продуктах птицеводства — мясе, субпродуктах и яйцах, что представляет собой угрозу благополучию потребителя [2], [3].

Традиционно индикацию сальмонелл проводят с помощью биохимических тестов, однако, их существенным недостатком является длительность — от 48 часов до 5–7 суток [4]. С иммунологической точки зрения у сальмонелл используют в диагностике два антигенных комплекса: О-антиген (соматический) и Н-антиген (жгутиковый).

В последнее время все большее распространение получают молекулярно-генетические системы идентификации бактерий не только на видовом уровне (диагностика), но и на штаммовом, что крайне важно для мониторинга за

 © Авторы статьи / Authors of the article

распространением возбудителя в объектах внешней среды, установления путей передачи и источника инфекции [5]. Метод ПЦР давно зарекомендовал себя как надежный молекулярно-генетический метод, позволяющий выявить ничтожно малые количества генетического материала возбудителей в биоматериале.

Актуальность исследований диктуется, прежде всего, необходимостью понимания потенциальной чувствительности ПЦР в детекции ДНК сальмонеллы, так как в начале инфекционного процесса в биоматериале может быть очень малое число клеток возбудителя.

Наибольшие показатели чувствительности достигаются при использовании ПЦР в режиме реального времени (кПЦР). Исследования показывают, что аналитическая чувствительность таких тест-систем может достигать 2,8–7,0 копий ДНК/мкл для очищенных образцов, что на 1–3 порядка превышает чувствительность обычной ПЦР [6]. В пересчете на бактериальные клетки минимальный порог обнаружения для обычной ПЦР может составлять 5×10^{o} копий/мкл ДНК [7].

Чувствительность ПЦР существенно зависит от биологического материала. Например, колумбийские авторы определили минимальную обнаруживаемую концентрацию: 1×10^{1} КОЕ/мл для крови и 4×10^{2} КОЕ/мл для фекалий. Более низкая чувствительность в фекалиях объясняется наличием ингибиторов ПЦР и неравномерным распределением бактерий [8].

Методы и принципы исследования

Во многих статьях предлагается использовать специфичный для сальмонелл ген инвазивности *InvA*, данные по этому гену также представлены в базе NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=inva, ID 1254419). Проверка в базе данных NCBI (модуль BLAST) также показала специфичность этого праймера для бактерий вида *S. enterica*. Видовая принадлежность бактериальных изолятов подтверждалась на дифференциально-диагностических средах по общепринятым методикам. После выращивания бактерии выделяли геномную ДНК с использованием стандартного фенольно-детергентного способа. Количество ДНК определяли в спектрофотометре NonoDrop2000™, в образцах концентрация ДНК составляла 100±10 нг/мкл. Таким образом, учитывая массу одной молекулы геномной ДНК бактерии примерно $0{,}5x10^{-5}$ нг (расчет исходя из размера генома 4,8 млн пар оснований, массы одной пары нуклеотидов 660 дальтон и число Авогадро $6{,}02x10^{23}$), при внесении 1 мкл неразведенной ДНК в ПЦР-смеси будет примерно $2x10^{7}$ молекул. Таким образом, при разбавлении образцов ДНК в 10, 100, 1000, 10 000, 100 000 и 1000 000 раз, количество молекул ДНК сальмонеллы в ПЦР-смеси будет $2x10^{6}$, $2x10^{5}$, $2x10^{4}$, $2x10^{3}$, $2x10^{2}$ и $2x10^{1}$, соответственно.

В работе использовали три пары праймеров для амплификации разных участков гена инвазивности (*InvA*) (Табл.1).

Таблица 1 - Отобранные праймеры для видоспецифической диагностической ПЦР с получением амплификата разной длины

DOI: https://doi.org/10.60797/IRJ.2026.173.71.1

Праймеры	Последовательность нуклеотидов	Длина фрагмента, п.о.	Т отжига, ºС	Т элонгации, ºС
InvA1 F InvA1 R	CACCGTGCTGCTTTCTCTACTTAACA TTATATTGTTTTTATAACATTCACTGAC	2058	60°C 15 сек	72°C – 60 сек
InvA2 F InvA2 R	CTTGATTGAAGCCGATGCCG CGTCATGATATTCCGCCCCA	550	60°C 15 сек	72°C – 60 сек
InvA3 F InvA3 R	GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284	60°C 15 сек	72°C – 60 сек

Примечание: источники [9], [10]

Основные результаты

Как известно, чувствительность и специфичность ПЦР падает с увеличением длины амплификата, так как Taq-полимераза может обрывать реакцию, что приводит к появлению больших фрагментов разной длины. Поэтому в рамках данной работы были также протестированы более короткие праймеры — 550 п.о. и 284 п.о. с целью предполагаемого повышения чувствительности анализа.

 © Авторы статьи / Authors of the article

В предварительных экспериментах проводили амплификацию с девятью изолятами. Неожиданно, при использовании не разведенной выделенной ДНК три изолята (6s, 8s и 58s не дали амплификационного сигнала для наиболее длинного фрагмента — 2058 п.о.). Причем это наблюдалось и в повторном эксперименте. В случае более коротких амплификатов реакция прошла успешно. В то же время разведенная ДНК давала четкий сигнал во всех вариантах, включая фрагмент в 2058 п.о. Единственным объяснением может быть то, что в не разведенной ДНК могут присутствовать следы каких-то ингибиторов, мешавших амплификации длинных фрагментов (при выделении ДНК использовали фенол, протеиназу К, додецилсульфат натрия).

В следующем эксперименте использовали не разведенную ДНК *S.enterica* и разведенную в 10 и 100 раз на примере трех изолятов — 2s, 6s и 8s (Рис.1). В этом случае использование всех девяти изолятов не дало бы дополнительной информации по чувствительности анализа. Снова, при использовании не разведенной ДНК и длинного амплификата в 2058 п.о. сигнал был слабым и выявлялся только в дорожке с изолятом 2s (Рис. 1). При разведении в 10 и 100 раз наряду с короткими фрагментами появлялся длинный амплификат 2058 п.о., но сигнал был слабым особенно при разведении в 100 раз, что подчеркивает относительную неэффективность амплификации длинных фрагментов. Данный результат также свидетельствует о влиянии ингибиторов на ход амплификации в случае с длинными фрагментами. Разведение делает концентрацию ингибиторов ниже, что позволяет проходить ПЦР.

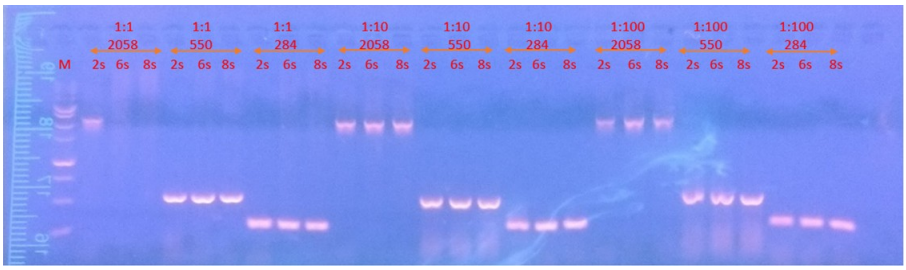


Рисунок 1 - Результаты ПЦР на трех изолятах *S.enterica* с разными парами праймеров к гену InvA с неразведенной ДНК и разведениями в 10 и 100 раз

DOI: https://doi.org/10.60797/IRJ.2026.173.71.2

Примечание: InvA1 – 2058 п.о., InvA2 – 550 п.о., InvA3 – 284 п.о.

Работу продолжили с разведениями ДНК в 100 раз (контроль), 1000 и 10 0000 раз. Снова детектировали слабый длинный фрагмент при разведении в 100 раз, который полностью исчезал при больших разведениях (Рис. 2). Интересно, что амплификация с продуктами 550 п.о. (InvA2) и 284 п.о. (InvA3) не зависела от разведения ДНК, что предполагает целесообразность дальнейших разведений с целью определить лимит чувствительности ПЦР-анализа.

Детектировали слабый длинный фрагмент при разведении в 100 раз, который полностью исчезал при больших разведениях (Рис. 2). Интересно, что амплификация с продуктами 550 п.о. (InvA2) и 284 п.о. (InvA3) не зависела от разведения ДНК, что предполагает целесообразность дальнейших разведений с целью определить лимит чувствительности ПЦР-анализа.

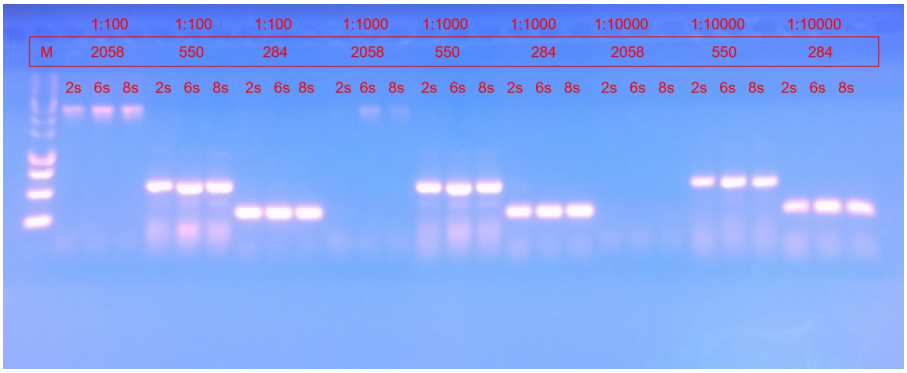


Рисунок 2 - Результаты ПЦР на трех изолятах *S.enterica* с разными парами праймеров к гену InvA с разведениями ДНК 100, 1000 и 10 000 раз

DOI: https://doi.org/10.60797/IRJ.2026.173.71.3

Примечание: InvA1 – 2058 п.о., InvA2 – 550 п.о., InvA3 – 284 п.о.

 © Авторы статьи / Authors of the article

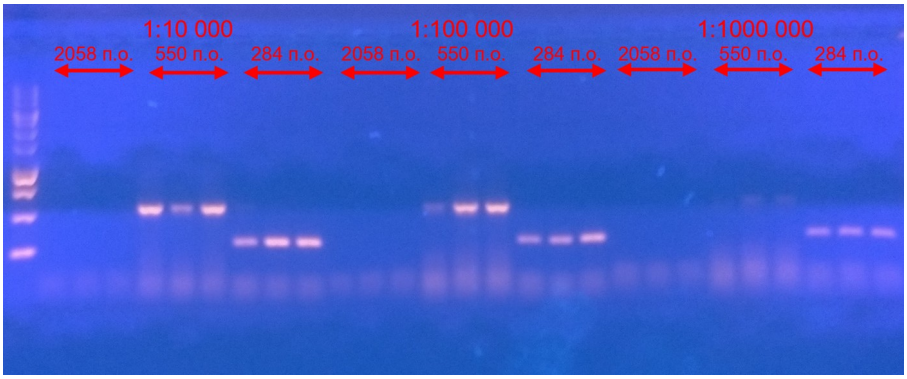


Рисунок 3 - Результаты ПЦР на трех изолятах *S.enterica* с разными парами праймеров к гену InvA с разведениями ДНК 10 000, 100 000 и 1000 000 раз

DOI: https://doi.org/10.60797/IRJ.2026.173.71.4

Примечание: InvA1 – 2058 п.о., InvA2 – 550 п.о., InvA3 – 284 п.о.

Большее разведение образцов ДНК (разведение в 10 000 раз — контроль) привело к амплификации обоих коротких фрагментов в 550 п.о. и 284 п.о. при разведении в 10 000 раз. Большие разведения приводят к постепенному угасанию сигнала для фрагмента 550 п.о., при этом самый короткий фрагмент 284 п.о. продолжал выявляться даже в разведении в 1000 000 раз (Рис. 3).

Заключение

Лимитирующим фактором в ПЦР является не количество матричной ДНК, а другие факторы (например, исчерпание праймеров, нуклеотидов). Использование праймера InvA3, дающего фрагмент в 284 пары оснований, позволяет достичь максимальной чувствительности анализа при разведении образца в миллион раз, что соответствует 20 копиям геномной ДНК в 1 мкл (количество, вносимое в ПЦР-пробирку).

Таким образом, можно рекомендовать при постановке диагностических ПЦР разводить образцы ДНК как минимум в 10 раз, чтобы свести концентрацию ингибиторов к минимуму и использовать праймер InvA3 для достижения максимальной чувствительности сигнала, что важно в случае малого количества микробных клеток в биоматериале. Это необходимо, чтобы понять, будет ли пригоден биоматериал, изолированный от птиц, больных сальмонеллезом без этапа выращивания бактерии и выделения ДНК, пригоден для ПЦР-диагностики.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Сообщество рецензентов Международного научно-исследовательского журнала
DOI: https://doi.org/10.60797/IRJ.2026.173.71.5

Conflict of Interest

None declared.

Review

Community of Reviewers of the International Research Journal
DOI: https://doi.org/10.60797/IRJ.2026.173.71.5

Список литературы / References

1. Новикова О.Б. Сравнительный анализ микрофлоры, выделяемой от сельскохозяйственной птицы разных видов, и контроль бактериальных болезней в птицехозяйствах / О.Б. Новикова, А.О. Герасимова, Д.А. Красков // Вестник Курганской ГСХА. — 2024. — 4(52). — С. 31–40.

2. Александрова Я.Р. Выявление сальмонелл в биологическом материале животных, птицы и животноводческой продукции / Я.Р. Александрова, С.С. Козак, М.Ф. Боровков и др. // Вестник Чувашского государственного аграрного университета. — 2023. — 1(24). — С. 45–49. — DOI: 10.48612/vch/859n-x394-vdea

3. Давлеев А.Д. Профилактика сальмонеллеза в европейском птицеводстве / А.Д. Давлеев // Птица и птицепродукты. — 2020. — 6. — С. 58–61.

4. Rousou X. Diagnostic Accuracy of Multiplex NAAT/PCR and Culture Against Salmonella spp.: A Comparison of Meta-Analytical Methods / X. Rousou, L. Furuya-Kanamori, E. Meletis et al. // Pathogens. — 2025. — 15(1). — P. 45. — DOI: 10.3390/pathogens15010045

5. Chirambo A.C. Performance of molecular methods for the detection of Salmonella in human stool specimens / A.C. Chirambo, T.S. Nyirenda, N. Jambo et al. // Wellcome Open Research. — 2021. — № 5. — Article 237. — DOI: 10.12688/wellcomeopenres.16305.2

6. Priya G.B. Development of TaqMan Probe-based Real-Time PCR Assays for Rapid Detection of Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, and Salmonella spp. in Meat and Evaluation of Effect of Brief Enrichment on Their Sensitivity / G.B. Priya, R.K. Agrawal, A.A.P. Milton // Food Anal. Methods. — 2026. — 19(38). — DOI: 10.1007/s12161-025-02924-6

7. Boyan G. Sensitive visual detection of Salmonella using a combination of PCR and CRISPR /Cas13a / G. Boyan, Z. Changyu, Z. Yu et al. // International Dairy Journal. — 2025. — 164. — DOI: 10.1016/j.idairyj.2025.106185

 © Авторы статьи / Authors of the article

8. Sánchez-Jiménez M.M. Validation of a PCR for diagnosis of typhoid fever and salmonellosis by amplification of the hilA gene in clinical samples from Colombian patients / M.M. Sánchez-Jiménez, N. Cardona-Castro // J Med Microbio. — 2004. — 9. — P. 875–878. — DOI: 10.1099/jmm.0.45630-0

9. El-Sebay N.A. InvA Gene Sequencing of Salmonella typhimurium Isolated from Egyptian Poultry / N.A. El-Sebay, H.M.A. Shady, S. El-Zeedy et al. // Asian Journal of Scientific Research. — 2017. — 10. — P. 194–202. — DOI: 10.3923/ajsr.2017.194.202

10. Kovács D. A semi-nested PCR method with increased sensitivity for the specific, direct detection of *Salmonella enterica* strains in poultry ectoparasites / D. Kovács, A. Szmolka, L. Kovács et al. // Acta Vet Hung. — 2023. — 71(3-4). — P. 137–141. — DOI: 10.1556/004.2023.01011

Список литературы на английском языке / References in English

1. Novikova O.B. Sravnitel'ny'j analiz mikroflory', vy'delyaemoj ot sel'skoxozyajstvennoj pticy' razny'x vidov, i kontrol' bakterial'ny'x boleznej v pticexozyajstvax [Comparative analysis of microflora isolated from the poultry of different species and control of bacterial diseases in poultry farms] / O.B. Novikova, A.O. Gerasimova, D.A. Kraskov // Bulletin of the Kurgan State Agricultural Academy. — 2024. — 4(52). — P. 31–40. [in Russian]

2. Aleksandrova Ya.R. Vy'yavlenie sal'monell v biologicheskom materiale zhivotny'x, pticy' i zhivotnovodcheskoj produkcii [Detection of salmonella in biological material of animals, poultry and livestock products] / Ya.R. Aleksandrova, S.S. Kozak, M.F. Borovkov et al. // Bulletin of the Chuvash State Agrarian University. — 2023. — 1(24). — P. 45–49. — DOI: 10.48612/vch/859n-x394-vdea [in Russian]

3. Davleev A.D. Profilaktika sal'monelleza v evropejskom pticevodstve [Salmonellosis prevention in Europe poultry breeding] / A.D. Davleev // Poultry and Chicken Products. — 2020. — 6. — P. 58–61. [in Russian]

4. Rousou X. Diagnostic Accuracy of Multiplex NAAT/PCR and Culture Against Salmonella spp.: A Comparison of Meta-Analytical Methods / X. Rousou, L. Furuya-Kanamori, E. Meletis et al. // Pathogens. — 2025. — 15(1). — P. 45. — DOI: 10.3390/pathogens15010045

5. Chirambo A.C. Performance of molecular methods for the detection of Salmonella in human stool specimens / A.C. Chirambo, T.S. Nyirenda, N. Jambo et al. // Wellcome Open Research. — 2021. — № 5. — Article 237. — DOI: 10.12688/wellcomeopenres.16305.2

6. Priya G.B. Development of TaqMan Probe-based Real-Time PCR Assays for Rapid Detection of Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, and Salmonella spp. in Meat and Evaluation of Effect of Brief Enrichment on Their Sensitivity / G.B. Priya, R.K. Agrawal, A.A.P. Milton // Food Anal. Methods. — 2026. — 19(38). — DOI: 10.1007/s12161-025-02924-6

7. Boyan G. Sensitive visual detection of Salmonella using a combination of PCR and CRISPR /Cas13a / G. Boyan, Z. Changyu, Z. Yu et al. // International Dairy Journal. — 2025. — 164. — DOI: 10.1016/j.idairyj.2025.106185

8. Sánchez-Jiménez M.M. Validation of a PCR for diagnosis of typhoid fever and salmonellosis by amplification of the hilA gene in clinical samples from Colombian patients / M.M. Sánchez-Jiménez, N. Cardona-Castro // J Med Microbio. — 2004. — 9. — P. 875–878. — DOI: 10.1099/jmm.0.45630-0

9. El-Sebay N.A. InvA Gene Sequencing of Salmonella typhimurium Isolated from Egyptian Poultry / N.A. El-Sebay, H.M.A. Shady, S. El-Zeedy et al. // Asian Journal of Scientific Research. — 2017. — 10. — P. 194–202. — DOI: 10.3923/ajsr.2017.194.202

10. Kovács D. A semi-nested PCR method with increased sensitivity for the specific, direct detection of *Salmonella enterica* strains in poultry ectoparasites / D. Kovács, A. Szmolka, L. Kovács et al. // Acta Vet Hung. — 2023. — 71(3-4). — P. 137–141. — DOI: 10.1556/004.2023.01011