

Анотація. В роботі приведені деякі аспекти сучасної епізоотичної ситуації по хворобі Гамборо в світі та в Україні. Головним умовою ефективного профілактики ІББ є відповідність антигенних властивостей польових ізолятів збудителя та штамів, використовуваних для виготовлення вакцин.

Ключові слова: епізоотична ситуація, циплята, імунodefіцит, вакцинація, іммуносупресія, хвороба Гамборо.

SOFTWARE EPIZOOTIC ENVIRONMENT POULTRY FARMS UKRAINE INFECTIOUS BURSAL DISEASE

Stegniy B.T., Dr.Sci. (vet.), Prof., academician of NAAS of Ukraine

Potrjasajeva E.A., postgraduate student,

Muzyka D.V., PhD (vet.),

Rula O.N., PhD (vet.), sen. Res.,

Usova L.P., yun. Res.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

Gontar' A.M., cand. of vet. Sciens, associate professor

Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv

Summary. The paper presents some aspects of current epizootic situation Gumboro disease in the world and in Ukraine. The main condition for the effective prevention of IBD is to match the antigenic properties of field isolates of the pathogen and the strains used for vaccine production.

Key words: epizootic situation, chickens, immunodeficiency, vaccination, immunosuppression, Gumboro disease.

УДК 637.075:579.22

АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ЦІЛЮВИХ ГЕНІВ ТА ПРАЙМЕРІВ, ЯКІ ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ ДЛЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ЩОДО ВИЯВЛЕННЯ БАКТЕРІЙ ENTEROBACTER SAKAZAKII (CRONOBACTER SPP.)

Гришина Є.А., аспірант⁹ grishina_zifer@mail.ru

Сумський національний аграрний університет, м. Суми

Анотація. З аналізу наукової літератури стосовно цільових генів специфічних бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) встановлено, що для полімеразної ланцюгової реакції використовують наступні гени-мішені: 16SrRNA, *gluA*, *ompA*, *dnaG*, *gyrB*; *MMS atpD*, *fusA*, *glnS*, *gltB*, *gyrB infB*, *ppsA*, оперон (*dnaG*, *rpsU*, *rpoD*). На основі цього було розроблено кілька пар олігонуклеотидних праймерів, специфічних різним ділянкам гена 16SrRNA. При використанні цих праймерів в ПЛР з ДНК виділених ізолятів були отримані попередні позитивні результати з 20 ізолятами бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*).

Ключові слова: *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*), полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), 16SrRNA, олігонуклеотидні праймери.

Актуальність проблеми. Бактерії *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) є маловивченими мікроорганізмами в Україні, проте визнані на міжнародному рівні як небезпечні патогени, що можуть спричинити раптову смертність у дітей до року. В країнах ЄС та СOT протягом останніх кілька десятиріч виявлення та ідентифікація даного мікроорганізму є обов'язковою в контролі виробництва сухих молочних сумішей для дитячого харчування [1, 4, 6, 15, 17].

На сьогоднішній день в світовій практиці існує один стандартний – еталонний метод виділення бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) згідно ISO/TS 22964:2006(E) IDF/RM 210:2006(E) та три методи визначення кількості даного мікроорганізму (Європейський, Канадський

⁹ Науковий керівник: Бергілевич О. М., д.в.н., професор Сумського НАУ

та FDA-метод), які базуються на встановленні найбільш вірогідного числа (НВЧ) бактерій в досліджуваних пробах [1, 7, 8].

В Україні розроблені методичні рекомендації, що гармонізовані з вищенаведеними сучасними міжнародними вимогами та які містять узагальнені дані про морфологію бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*), їх культуральні та біохімічні властивості та лабораторні методи їх виявлення й ідентифікації [2]. Проте дані методи, як і будь які класичні методи, займають багато часу на дослідження, є трудомісткими та потребують обізнаності дослідника. Крім того, літературні дані стверджують про те, що лабораторні методи індикації та ідентифікації даного виду мікроорганізму недостатньо точними у порівнянні з генетично-молекулярними, які є більш достовірними [3, 16]. Отже, останнім часом актуальним постало питання розробки більш чутливих та швидких молекулярно-генетичних методів, які вважаються надійною альтернативою традиційним лабораторним методам.

Також, необхідно звернути увагу на те, що метод, що зазначений в ISO / TS 22964: 2006 був опублікований до того як була проведена рекласифікація *Enterobacter sakazakii* як *Cronobacter spp.* у 2008 році. Дана рекласифікація базувалася на детальному та всебічному вивченні фенотипічні характеристик збудника кількома незалежними молекулярними методами. Нова рекласифікація мікроорганізму представлена на сторінках International Journal of Systematic and Evolutionary Biology (58, 2008) та погоджена на 31 сесії Комісії Кодекс Аліментаріус у 2008 році [9].

Отже, з 2008 року *Enterobacter sakazakii* рекласифікований як *Cronobacter spp.*, який налічує шість окремих видів та 16 біогруп, що об'єднані в один рід *Cronobacter*, який належить до родини *Enterobacteriaceae*. Рід *Cronobacter* представлений: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter dublinensis* та *Cronobacter genomospecies 1*. Але найчастіше поряд із новою назвою роду *Cronobacter* користуються і старою назвою [2, 9].

Останнім часом, FAO/ВОЗ було рекомендовано подальше наукове вивчення бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) та сприяння використанню в лабораторній практиці молекулярно-генетичних методів [17].

Враховуючи вищезазначене актуальним та необхідним є розробка та впровадження в лабораторну практику сучасних, швидких, точних методів, яким є метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Але першочерговим і важливим моментом при розробці даного методу є пошук специфічних генів з послідуочим синтезом високоспецифічних олігонуклеотидні праймерів для даної реакції. Актуальність таких досліджень підтверджується тим, що превалювання специфічних генів в бактеріях обумовлюється їх географічним походженням та впливом факторів довкілля, що можуть спонукати мутації та надавати мікроорганізму нових характеристики, в тому числі факторів вірулентності, які роблять їх більш небезпечними.

Метою даної статті є наведення аналізу даних літератури щодо цільових генів специфічних бактеріям *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*), які застосовуються в молекулярно-генетичному аналізі в різних країнах та експериментально підібрати високоспецифічний ген для вітчизняних ізолятів вищезазначеного виду мікроорганізмів для розробки олігонуклеотидних послідовностей (праймерів) для ПЛР.

Завдання дослідження. На основі аналізу цільових генів для бактерії *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) експериментально підібрати високоспецифічний для вітчизняних ізолятів *Enterobacter sakazakii* для розробки методу ПЛР.

1. Здійснити пошук та розробити високоспецифічні олігонуклеотидні праймери для ПЛР та повести їх випробування.

Виконання вищезазначених завдань робить можливим розробити ефективний, чутливий та швидкий молекулярно-генетичний метод виявлення бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) в продовольчій сировині та харчових продуктах. Вищезазначене покращить проведення ветринарно-санітарного контролю за небезпечним харчовим патогеном відповідно до сучасних європейських вимог.

Матеріал і методи дослідження. Матеріалом для даної роботи є відкриті бази даних нуклеотидних послідовностей генів бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) та дані патентів, наукових статей чи робіт. При цьому використовували аналітичні методи.

Розробку та випробування високоспецифічних олігонуклеотидних праймерів для полімеразної ланцюгової реакції проводили на базі відділу молекулярної біології і імунохімії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ, м. Київ). Усі олігонуклеотидні праймери, які фланкують фрагменти гену 16SrDNA були розраховані за допомогою програмного забезпечення «VectorNTI»v.11.0.1 (Invitrogen) та синтезовані в «ThermoHybaid. BioSciences» (Німеччина). Для аналізу гомології нуклеотидної послідовності ДНК

Enterobacter sakazakii (*Cronobacter spp*) з генами інших бактерій використовували електронну службу BLAST 2.0 Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) США та модуль «AlignX» програмного забезпечення «VectorNTI».

Індикацію та ідентифікацію польових ізолятів *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) з сирого молока та об'єктів молочних ферм Сумської області проводили на базі науково-навчальних лабораторій Сумського НАУ у відповідності до методичних рекомендацій [2].

Результати дослідження. Відомо, що бактерії *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) мають подібні біохімічні характеристики з іншими видами з родини *Enterobacteriaceae*, і на самперед це *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* та *Enterobacter (Pantoea) agglomerans*. Впершу чергу, це подібні морфологічні властивості (грамнегативні тонкі палички, розміром 0,3 – 1,0 x 0,6 – 1,0 мкм, рухливі, спор не утворюють) та культуральні (ростуть в присутності кисню та без нього на середовищах для ентеробактерій, не потребують в якості стимуляторів росту вітамінів та амінокислот), їх видова ідентифікація та диференціація повинна бути підтверджена біохімічними властивостями.

Існує дві основні біохімічні відмінності між *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) та іншими видами ентеробактерій. По-перше, це глюкозидна активність (утворення кислоти із α -метил-D-глюкозиду), інша ж відмінність – це негативна реакція на D-сорбітол.

Саме на пошук та виявлення частинок генів, які відповідають за ці властивості, спрямована увага багатьох дослідників в усьому світі. В науковій літературі, в відкритих та комерційних базах даних нуклеотидних послідовностей генів існує ряд відомостей щодо їх специфічності стосовно бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*).

На основі проведеного аналізу даних літератури ми сформували базу даних специфічних праймерів з нуклеотидними послідовностями генів для бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*), яка представлена в таблиці 1.

Як видно з таблиці 1, існує декілька специфічних генів, які можна використовувати як цільові гени-мішені для ідентифікації *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) молекулярно-генетичним методом. Наведені в даній таблиці ампліфікаційні розміри дають змогу підтвердити специфічність праймеру при розробленні ПЛР.

Таблиця 1.

Приклади праймерів та ПЛР програми			Розмір фрагмента	Джерело
Праймер (його назва та послідовність)	ПЛР програма			
1	Esak2 (5'-CCCGCATCTGCGAGATTCTC-3')	16S rRNA 35x 95°C-35с,	900	Keyser M та ін., 2003
2	Esak3 (5'-СТААТАСССGCАТААССGТСТАСG-3) Saka 1a ACAGGAGACAGCTTGCTGCC	61°C-60s, 72°C-60s 95°C 4 хв; 30 циклів 95°C по 60 с; 50°C 1 хв; 72°C по 90 с 30x: 94°C-30с,	952	
3	Esakf (5'-GCTYTGCTGACGAGTGGCGG-3)	64°C-64с, 72°C-90с 30x 95°C-15с; 52°C-30с; 72°C-90с	929	Lehner A. та ін., 2004
4	Esakr (5'-ATCTCTGCAGGATTCTCTGG-3)	10 x 95°C; 30 x 30 с при 95°C; 30 с 56°C; 2 x 72°C; 5 x 72°C.	1450	
5	660-V-1 (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTC-3)	ген Dna G		
6	630R (5'-САКАААGAGGATGATCC-3)	real-time PCR		Seo K.H., Та ін., 2005
7	P0 (5'-AGA GTT TGA TGC TGG CTC AG-3')	ген <i>gluA</i>		
8	P6 (5'-GTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3') 095P (5'-TAC GGC GTG GAC TAC CAG- 3')			
9	6-carboxyfluorescein-ACA GAG TAG TAG TTG TAG AGG CCG TGC TTC C-)			
10	EsAgf (Es gluAf) (5'-TGA AAG CAA TCG ACA AGA AG-3')		1 680 bp	Lehner A. та ін., 2006
11	EsAgr (Es gluAf) (5'-ACT CAT TAC CCC TCC TGA TG-3')			
12	EsAg5f (5'-TAT CAG ATC TAC CCG CGC-3')		105-bp	
13	EsAg5_5r (5'-TTG ATG CCA AGC TGT TGC-3')	<i>ompA-targeted PCR</i>		
14	ESSF (5'-GGATTTAACCGTGAACTTTCC-3_)	<i>ompA</i>	469-bp	Mohan Nair та ін., 2006
15	ESSR (5'-CGCCAGCGATGTTAGAAGA-3_)	Real-time PCR		
16	Entsa-F 1 (5'-CCA AAG CTT CCG CAG TGA A-3) (Acc.-number L01755)	Real-time PCR	19 bp	Heuvelink A. та ін., 2004
17	Entsa-R 1		27 bp	

	(5-CAA TAT CCC CTG AGG AAT TAG TAC AGA-3) (Acc.-number L01755) Entsa-S 1				
18	(5-FAM-CGT CAC GCG AAG AAA CTG GCT CG-TAMRA-3) (Acc.-number L01755)			23 bp	
19	(5-IPC-F (5-TGT GAA ATA CCG CAC AGA TG-3) (Acc.-number L09137)			20 bp	
20	(5-IPC-R (5-AGC TGG CGT AAT AGC GAA G-3) (Acc.-number L09137)			19 bp	
21	(5-IPC-S (5-HEX-GAG AAA ATA CCG CAT CAG GC-TAMRA-3) (Acc.-number L09137)			20 bp	
22	(5-Entsa-F 2 (5-CCG GAA CAA GCT GAA AAT TGA-3) (Acc.-number AY748357)			21 bp	Liu Y. та ін. , 2006
23	(5-Entsa-R 2 (5-TCT TCG TGC TGC GAG TTT G-3) (Acc.-number AY748357)			19 bp	
24	(5-Entsa-S 2 (5-FAM-ACT CTG ACA CAC CCG GCA TTC CTG-TAMRA-3) (Acc.-number AY748357)			24 bp	
25	(5-IPC-F (5-TGT GAA ATA CCG CAC AGA TG-3) (Acc.-number L09137)			20 bp	
26	(5-IPC-R (5-AGC TGG CGT AAT AGC GAA G-3) (Acc.-number L09137)			19 bp	
27	(5-IPC-S (5-HEX-GAG AAA ATA CCG CAT CAG GC-TAMRA-3) (Acc.-number L09137)			20 bp	

Ми також проаналізували дані літератури про властивості специфічних генів *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*), які представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Властивості специфічних генів *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*)

Ген	Властивості гену
<i>ompA</i>	Відіграє важливу роль в прикріпленні до клітин організму господаря та стійкості до макрофагів.
<i>gluA, dnaG</i>	Глюкозидазна активність
<i>rps U, proD</i>	Розрізняють види <i>Cronobacter spp.</i>
<i>atpD, fusA, glnS, gltB, gyrB infB, i ppsA</i>	

Дані таблиці 2 свідчать про специфічність кожного гену, що може бути використано для аналізу властивостей видів *Cronobacter spp.* та слугують основою для розроблення пар олігонуклеотидних праймерів специфічних різним ділянкам гена.

Для визначення наявності специфічних генів у вітчизняних штамів *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) методом ПЛР, ми підібрали біля 30 польових ізолятів, які були виділені з сирого молока та об'єктів молочних ферм та за морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями були нами віднесені до *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*). Крім того в даному дослідженні була еталонна культура *Enterobacter sakazakii* M1, яка задепонована у колекції Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ, м. Київ).

В результаті проведеного пошуку та аналізу послідовностей генів з консервативними та варіабельними ділянками у бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*), були розроблені кілька пар олігонуклеотидних праймерів специфічних різним ділянкам гена 16SrRNA (рис.1, табл. 3).

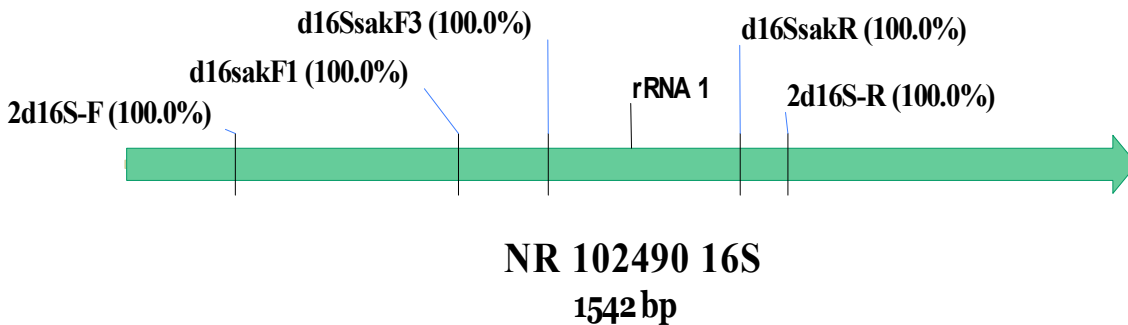


Рис.1. Характеристика гомології олігонуклеотидних праймерів на гені 16SrRNA *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*)

Пари олігонуклеотидних праймерів, специфічних різним ділянкам гена 16SrRNA та послідовності генів з консервативними та варіабельними ділянками у бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) представлені в таблиці 3.

Таблиця 3.

Олігонуклеотидні праймери, специфічні різним ділянкам гена 16SrRNA *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*)

Праймер	Послідовність (5'→3')	Розмір фрагмента (п.н.)
d16sakF1	ТААСТССГТГССАГСАГСС	451
d16SsakR	ТАААССАТГСТССАССГСТ	
d16SsakF3	ГГСАГГСТТГАГТСТСАГ	314
2d16S-F	АГСТААТАССГСАТААССГТСТАСС	863

2d16S-R	AGGCACTCCCGCATCTCTG	
---------	---------------------	--

При використанні цих праймерів в ПЛР з ДНК виділених ізолятів бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) були отримані попередні позитивні результати з 20 ізолятами із 35, що мали характерні для даного виду культуральні та біохімічні характеристики.

Висновки

1. З аналізу наукової літератури стосовно була створена база генів-мішеней, що спонукало до теоретичного вибору адекватного гену бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) для розробки методу на основі ПЛР.

2. Найчастіше для ПЛР діагностики *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) використовують наступні гени-мішені: 16SrRNA, gluA, ompA, dnaG, gyrB; MMS atpD, fusA, glnS, gltB, gyrB infB, rpsA, оперон (dnaG, rpsU, rpoD), в яких закодована інформація щодо характерних видоспецифічних властивостей даного мікроорганізму (глюкозидазна активність, утворення жовтого пігменту, видова належність до одного з видів *Cronobacter spp*)

3. Були розроблені кілька пар олігонуклеотидних праймерів, специфічних різним ділянкам гена 16SrRNA, при використанні яких в ПЛР з ДНК виділених ізолятів були отримані попередні позитивні результати з 20 ізолятами бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*).

Література

1. [Ефимочкина Н. Р.](#) Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа: автореф. дис. на соискание уч. степени док. биолг. наук: спец. 14.02.01 «Гигиена» /Н. Р. [Ефимочкина.](#) – Москва, 2010. – 40с.
2. Методи виділення та підрахунку кількості бактерій *Enterobacter (Cronobacter) sakazakii* / О.М. Бергілевич, В.В. Касянчук, Т.О. Гаркавенко, Н.А. Межинська // Затверджені науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України (протокол №1 від 23 грудня 2010 р). – 2010 – 38с.
3. Cawthorn D-M, Botha S, Witthuhn RC. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. *Int J Food Microbiol.* 2008;127:129-38.
4. Fiore Alfonsina, Casale Maria and Aureli Paolo. *Enterobacter sakazakii*: epidemiology, clinical presentation, prevention and control // *Ann Ist Super Sanità* 2008. - Vol. 44. - № 3. – P. 275-280.
5. Hassan AA, Akineden C, Kress C, Estuningsih S, Schneider E, Usleber E. Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method. *Int J Food Microbiol.* 2007;116:214-20.
6. Heuvelink A.E. Handhavingsactie *Enterobacter sakazakii* in poedervormige producten. Voedsel en Waren Autoriteit / A.E. Heuvelink, H. Moes, J. J. Tilburg [et al.]// Keuringsdienst van Waren Oost, 2004. – Projektnummer: OT03H006.
7. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula FDA (2002). Available from <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>
8. ISO/TS 22964:2006(E) IDF/RM 210:2006 (E) Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii* (Молоко та молочні продукти. Виділення *Enterobacter sakazakii*).
9. Iversen C. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and description of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonicus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies I. / C. Iversen, A. Lehner, N.Mullane // *BMC Evol Biol.* – 2007. – №7. – P64.
10. Keyser M. Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (UASB)-granular sludges enriched with *Enterobacter sakazakii* /M. Keyser, R. C. Witthuhn, L. C. Ronquest [et al.] // *Biotechnol. Lett.* – 2003. – V. 25. – P. 1893–1898.
11. Lehner A. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification / A. Lehner, T. Tasara, R. Stephan // *BMC Microbiol.* – 2004. – V. 4. – P. 43 – 48.
12. Lehner A, Nitzsche S, Breeuwer P, Diep B,elen K, Stephan R. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. *BMC Microbiol.* 2006;6-15
13. Liu Y. , Cai, X., X.Zhang, Gao, Q. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula / Y. Liu, X. Cai, X. Zhang [et al.] // *J. Microbiol. Meth.* – 2006. – V. 65. – P. 21 – 31.

14. Manoj Kumar Mohan Nair and Kumar S. Venkitanarayanan Cloning and Sequencing of the ompA Gene of *Enterobacter sakazakii* and Development of an ompA-Targeted PCR for Rapid Detection of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula. *App. And Env. Mic.* – 2006. – V. 72, №. 4. – P. 2539 – 2546
15. Seo KH, Brackett RE. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J Food Prot.* 2005;68:59-63
16. Warnken MB, Brandro MLL, Souza AE, Romro CMCPA, Nogueira ACMA, Destro MT. Phenotypic proles and detection of target genes by PCR in isolates from dierent proles and reference strains, idented as *Cronobacter spp.* (*Enterobacter sakazakii*). *Rev Inst Adolfo Lutz. Sro Paulo*, 2012; 71(1):21-31.
17. World Health Organization. 2004. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report. Microbiological risk assessment series, №. 6. Available from
18. http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/enterobacter_sakazakii/en

**АНАЛИЗ СУЩЕСТВУЮЩИХ ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ И ПРАЙМЕРОВ, КОТОРЫЕ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ
ДЛЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ОТНОСИТЕЛЬНО ВЫЯВЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ
ENTEROBACTER SAKAZAKII (CRONOBACTER SPP.)**

Гришина Е.А., аспирант grishina_zafar@mail.ru

Сумской национальный аграрный университет, г. Суми

Аннотация. Из анализа научной литературы относительно целевых генов специфических бактериям *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) установлено, что для полимеразной цепной реакции используют следующие гены-мишени: 16SrRNA, gluA, ompA, dnaG, gyrB; MMS atpD, fusA, glnS, gltB, gyrB infB, ppsA, оперон (dnaG, rpsU, rpoD). На основе этого было разработано несколько пар олигонуклеотидных праймеров, специфических различным участкам гена 16SrRNA. При использовании этих праймеров в ПЦР с ДНК выделенных изолятов были получены предварительные положительные результаты с 20 изолятами бактерий *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*).

Ключевые слова: *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*), полимеразная цепная реакция (ПЦР), 16SrRNA, олигонуклеотидные праймеры.

**ANALYSIS OF EXISTING TARGET GENES AND PRIMERS THAT ARE USED FOR
POLYMERASE CHAIN REACTION FOR IDENTIFICATION OF BACTERIA ENTEROBACTER
SAKAZAKII (CRONOBACTER SPP.)**

Grishina E., graduate student, grishina_zafar@mail.ru

Sumy National Agrarian University, Sumy

Summary. From the analysis of the scientific literature regarding the specific target genes to bacteria *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) was found that for polymerase chain reaction using the following target genes: 16SrRNA, gluA, ompA, dnaG, gyrB; MMS atpD, fusA, glnS, gltB, gyrB infB, ppsA, operon (dnaG, rpsU, rpoD). On the basis of this developed several pairs of oligonucleotide primers specific to various parts of 16SrRNA gene. By using these primers in PCR for DNA isolates were obtained preliminary positive results with 20 isolates of bacteria *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*).

Key words: *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*), polymerase chain reaction (PCR), 16SrRNA, oligonucleotide primers.